

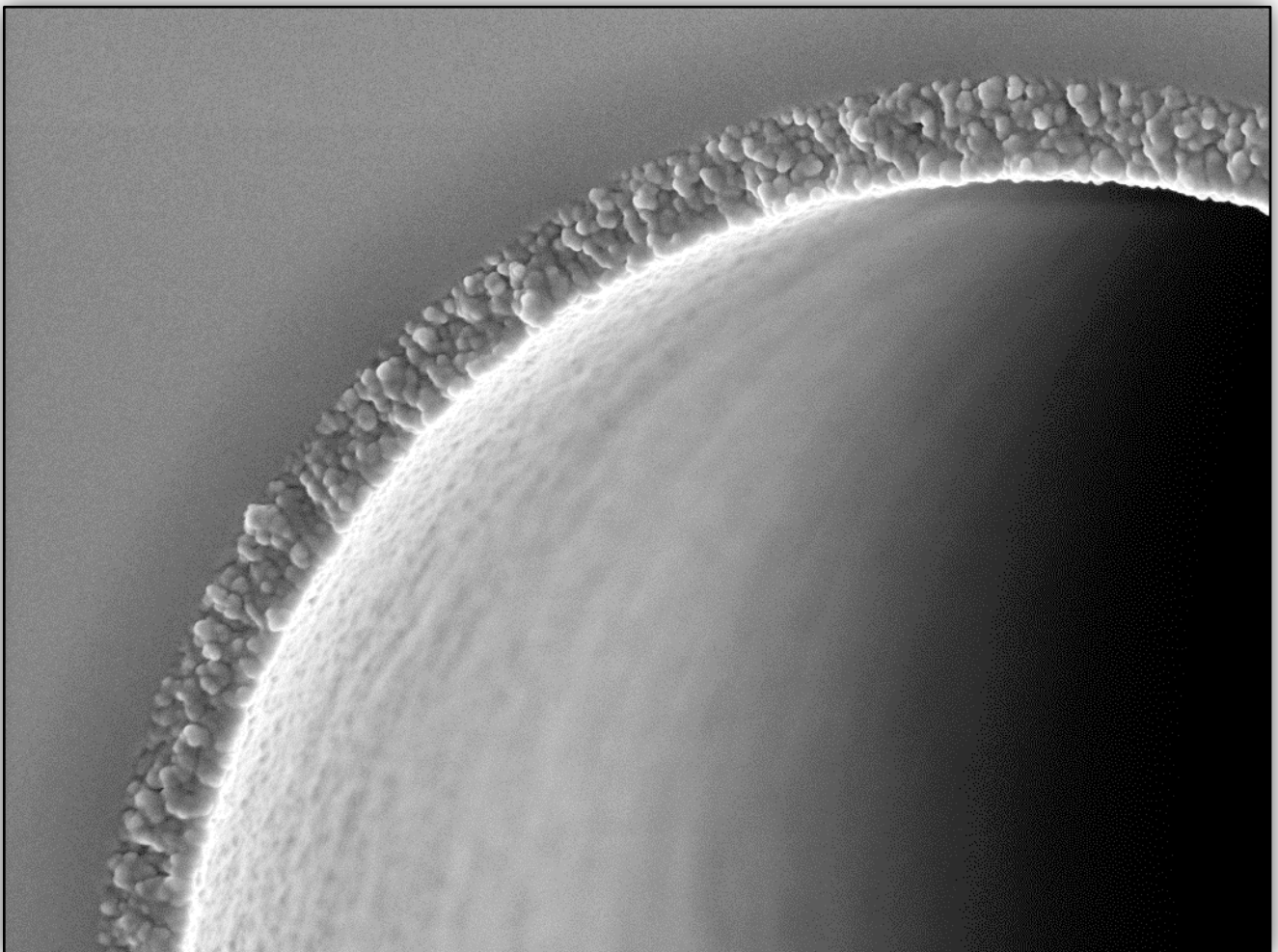
# Open tubular-Kapillaren für die Hochdruckflüssigchromatographie

Dissertation  
Simon Forster

Darmstadt  
10/2010 - 08/2013



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT





# Open tubular-Kapillaren für die Hochdruckflüssigchromatographie



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

genehmigte  
kumulative Dissertation

eingereicht von

Dipl.-Ing. Simon Forster  
aus Bad Ems

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent :	PD Dr. Egbert Müller

Tag der Einreichung:	29. Oktober 2013
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Dezember 2013

Darmstadt 2014

---

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar (Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt) und Dr. Stephan Altmaier (Merck KGaA, Lab Essentials, Darmstadt) von Oktober 2010 bis September 2013 angefertigt.

---



---

*"The universe doesn't care what you believe.  
The wonderful thing about science is that it doesn't  
ask for your faith, it just asks for your eyes."*

(Randall Patrick Munroe)

---

---

## Danksagung

---

Mein herzlicher Dank gilt allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar danke ich für die vertrauensvolle Übernahme der Leitung dieses externen Projektes und die damit verbundene, wissenschaftliche Betreuung durch ihn, aber auch durch seine kompetente Arbeitsgruppe.

Ich möchte mich bedanken bei der Merck KGaA für die Bereitstellung des Themas, die dazugehörigen, experimentellen Rahmenbedingungen sowie die Finanzierung über den gesamten Zeitraum. Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Freund und Betreuer Dr. Stephan Altmaier, auf dessen fundierten Rat und Unterstützung jeglicher Art ich jederzeit bedingungslos vertrauen konnte. Frau Dr. Karin Cabrera danke ich für die Freiheit, in einem Industrieunternehmen an diesem grundlagenorientierten Forschungsfeld arbeiten zu können, für die uneingeschränkte Möglichkeit zur Publikation, sowie für die – vor allem gegen Ende – sehr zielführenden Diskussionen für die „Zeit danach“.

Meinen lieben Laborkolleg(inn)en Vanessa Flink, Kristina Czerny, Anita Piper, Gisela Jung und Peter Knöll bin ich zu höchstem Dank verpflichtet, ohne eure unschätzbare (HPLC-)Erfahrung wären wohl viele meiner instrumentellen Probleme bis heute ungelöst.

Ich danke allen Doktoranden/-innen für eine wunderbare Zeit bei Merck. Ein besonderes Dankeschön gilt dabei meinem Kollegen Florian Capito für die freundschaftliche, gegenseitige Unterstützung während der letzten zwei Jahre.

Abschließend möchte ich meiner Freundin und meinen Freunden danken für das Verständnis gegenüber gelegentlicher Verstimmtheit. Meinen Eltern bin ich von Herzen dankbar für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne euch wären dieser Lebensabschnitt und damit auch diese Doktorarbeit unmöglich gewesen.

---

## Publikationsliste

---

Artikel zu OTLC-Kapillaren in "Journal of Chromatography A" (impact factor: 4,61):

- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2012, 1265, 88-94.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2013, 1283, 110-115.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10-20 micron open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2013, 1315, 127-134.

Artikel zur Applikationsentwicklung in „LCGC“ (impact factor: 0,87):

- Simon Forster, Stephan Altmaier, "*Simple and fast quantification of capsaicinoids in hot sauces using monolithic silica capillaries and LC/MS*", LCGC North America 2013, 31, 218-223. (Cover article)  
Zweitveröffentlichung (Kopie): LCGC Europe, 2013, 26, 326-329.
- Simon Forster, Stephan Altmaier, "*Qualitative LC-MS analysis of pesticides utilizing monolithic silica capillaries and potential for assay of pesticides in kidney*", LCGC Europe Sep. 2013, 488-497.

Weiterer Artikel zur Applikationsentwicklung (nicht peer-reviewed):

- Simon Forster, Stephan Altmaier, „*Wie scharf ist "hot"? – Analyse des Capsaicin-Gehalts in Chilisoßen*“, labor&more 2012, 4, 64-68.

---

Poster:

- Simon Forster, Sven Andrecht, Stephan Altmaier, "*Applications of new monolithic silica capillaries with various dimensions and surface modifications*", 36th HPLC symposium, 2011, Budapest, Hungary.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for nano-LC*", 37th HPLC symposium, 2012, Anaheim, USA.
- Simon Forster, Stephan Altmaier, "*Application of RP modified monolithic silica capillaries in the LC and LC-MS separation of capsaicinoids and pesticides*", 37th HPLC symposium, 2012, Anaheim, USA.
- Stephan Altmaier, Simon Forster, Egidijus Machtejevas, Karin Cabrera, David Lentz, "*LC-MS analysis of food and food additives with monolithic silica columns*", ASMS symposium, 2013, Minneapolis, USA.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Preparation and performance evaluation of new thick film silica open tubular capillaries for liquid chromatography*", GDCh Wissenschaftsforum, 2013, Darmstadt, Germany.

---

## Zusammenfassung

---

Miniaturisierte HPLC (high pressure liquid chromatography)-Systeme sind in der alltäglichen Anwendung noch eher selten vertreten. Die große Mehrheit der etablierten Methoden beinhalten 4,6 mm-Edelstahlsäulen. Moderne Anwendungsgebiete wie die Proteomforschung, Einzellanalysen oder klinische Applikationen könnten den Übergang solcher Formate von der Wissenschaft in die Praxis jedoch beschleunigen. Als größten Vorteil eines geringeren Säulenvolumens, direkte Konsequenz aller Miniaturisierungsansätze, kann die Verringerung des benötigten Injektionsvolumens und damit des Probenverbrauchs betrachtet werden. Besonders in probenlimitierten Separationsaufgaben ist eine Entwicklung hin zu kleineren Säulendimensionen unausweichlich. Neben dem naheliegendsten Prinzip des Packens poröser Partikel in fused silica-Kapillaren zählen ebenso monolithische *in situ*-Synthesen, Chips und open tubular (OT)-Kapillaren zur Klasse miniaturisierter Säulenformate. Letztere stellen heute das Standardformat in der Gaschromatographie dar, fristen in der Flüssigchromatographie jedoch ein auf die Wissenschaft beschränktes Randdasein. Zwar sind schon in den 1980er-Jahren die theoretischen Grundlagen für die Einschätzung des Leistungspotentials dieser Kapillarklasse gelegt worden, allein mangelt es bis heute an präparativen Fertigungstechniken zur Deposition eines dicken, homogenen, fest angebundenen und vollporösen Films an der Kapillarinnenwand. Präparative Verfahren aus den 1990er-Jahren boten mitunter vielversprechende Bodenzahlen, teilten jedoch durchweg das Problem zu geringer Retention bzw. impraktikabel geringer Beladungskapazität. Zusätzlich konnten zu dieser Zeit verfügbare Chromatographie-Instrumente nicht ohne weiteres Flussraten im nL/min-Bereich kontrollieren und Detektionsprobleme, aufgrund der sehr geringen Elutionsvolumina, spielten ebenfalls eine Rolle (moderne LC-Instrumente sind heute sehr viel besser für solche Dimensionen ausgelegt).

Durch Übertragung der sehr detailliert untersuchten Sol-Gel-Synthese zur Herstellung von Silica-Monolithen (NAKANISHI-Prozess) auf sehr kleine Dimensionen („confined spaces“, z. B. Kapillaren mit 10-20 µm Innendurchmesser) konnte ein neues, statisches Verfahren zur open tubular-Synthese entwickelt werden. Die physikalische Grundlage für diesen Prozess ist durch die Besonderheiten der Kombination aus Phasenseparation und Sol-Gel-Übergang in kleinen Reaktionsräumen gegeben, welche statt in einer dreidimensionalen, korallenartigen und vor allem ungerichteten Morphologie des resultierenden Materials in einer Schichtbildung entlang der begrenzenden Fläche resultiert. Wenn diese begrenzende Fläche eine sehr kleine, aber mehrere Meter lange fused silica-Kapillare ist, kann die ca. 500 nm dicke, vollporöse Schicht im Anschluss als stationäre Phase in der Kapillar-HPLC genutzt werden. Die Durchmesserabhängigkeit dieses Effekts konnte durch Synthesen in 50, 20, 15 und 10 µm Innendurchmesser (ID)-Varianten gezeigt werden. Qualitative Struktureigenschaften wie Schichtdicke und optische Homogenität wurden durch Anwendung von Rasterelektronenmikroskopie auf den Kapillarquerschnitt zugänglich. Die spezifische Oberfläche sowie Mesoporosität des Materials konnte nur indirekt über Stickstoffsorptionsmessungen mit bulk-Vergleichsmaterial erfolgen (ca. 200 m<sup>2</sup>/g, ca. 10 nm Porendurchmesser).

---

Die resultierenden Silica-Kapillaren wurden zur Trennung von Testgemischen sowie einfachen Applikationsbeispielen niedermolekularer Analyten (ca. 100-500 g/mol) in Normal- und Umkehrphase eingesetzt. Letztere wurde durch eine dem Herstellverfahren nachgeschaltete Octadecylsilan-Oberflächenmodifizierung ohne Endcapping-Schritt mit einem monofunktionellen Aminosilan realisiert. Es konnten zufriedenstellende Retentionsfaktoren im Umkehrphasen-Gradientenmodus in der (nicht Basislinien-)Trennung eines 32-Komponenten-Pestizidgemisches erhalten werden. Eine VAN DEEMTER-Auftragung für eine 15 µm ID-Variante wies ein Minimum von ca. 18 µm (Propylbenzol) für das Äquivalent eines theoretischen Bodens auf. Bezogen auf diese Bodenzahl/m-Bewertung sind open tubular-Kapillaren jedoch grundsätzlich nicht konkurrenzfähig, wird doch eine sehr wichtige Eigenschaft auf diese Weise nicht berücksichtigt: Die bis zu 600-fach höhere Permeabilität, im Vergleich mit jeweils einer partikelgepackten und monolithischen, kommerziell erhältlichen Silica-Kapillare, welche als Referenzsäulen fungierten. Erst die Leistungsbemessung nach einer kinetischen Optimierungsmethode, unter Berücksichtigung des deutlich reduzierten Fließwiderstands der OTs, ermöglichte eine faire Bewertung unter (für jede untersuchte Kapillare) optimalen Bedingungen. Dies beinhaltete eine Auftragung der minimalen Analysenzeit, welche zum Erreichen einer erforderlichen Bodenzahl benötigt wird (kinetische Plots). Dieser Ansatz ist in der Praxis wenig verbreitet, erforderte er bis zur Veröffentlichung eines einfachen Tools zur Umrechnung von  $H/u$ -Daten in  $t/N$ -Wertepaare (nach DESMET, 2005) noch iterative, computergestützte Simulationsschritte. Dieses Bewertungsverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur sinnvollen Bemessung des Leistungspotentials der synthetisierten open tubular-Kapillaren eingesetzt. Das Ergebnis ist in hervorragendem Einklang mit theoretischen Berechnungen anderer Autoren, da durch das hier vorgestellte neue Sol-Gel-Verfahren für LC-Phasensynthesen zum ersten Mal eine Möglichkeit zur reproduzierbaren Synthese dicker Schichten („thick film“) zur Verfügung steht. Für die kleinste Variante (10 µm ID) ist die kinetische Grenzleistung (die maximal erreichbare Leistung pro Analysenzeit unter Optimierung aller zur Verfügung stehenden Parameter) bereits höher als für die ebenfalls untersuchte, kommerzielle Referenzkapillare. Dies erfordert eine Durchführung am Drucklimit, welches instrumentell bedingt im vorliegenden Fall bei 350 bar lag. Die für diese Grundbedingung notwendige, variable Säulenlänge lässt sich im Falle von open tubular- (und ebenso für monolithische) Kapillaren aufgrund der Abwesenheit von Fritten sehr einfach realisieren. Das Problem unzureichender Retention sowie kaum realisierbarer geringer Beladungskapazität bisheriger, präparativer Arbeiten zur open tubular-Synthese konnte durch das neue Verfahren reduziert werden. Die experimentelle Bestätigung kinetischer *in silico*-Optimierungsmodelle sowie die Entwicklung des benötigten Herstellverfahrens selbst stellt, zusammengefasst, den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn dieser kumulativen Dissertation dar.

---

## Summary

---

Miniaturized HPLC-systems are still far away from being used every day as the vast majority of running methods involve 4.6 mm stainless steel housings. Modern research areas such as proteomics, single cell-analysis or clinical applications might, in the near future, accelerate the transition from academic research to the chromatography market. The most important advantage of downsizing column volume, as a consequence of any miniaturization approach, is the reduction of the injection volume needed, and therefore, a decrease in sample consumption. Consequently, in sample-limited applications, development towards miniaturized HPLC columns is just mandatory. Although it seems natural packing porous particles in smaller fused silica capillaries, monolithic *in situ*-syntheses, chips and open tubular-capillaries likewise can be considered as miniaturized LC systems. Despite some crucial distinctions, the latter represent the current stationary phase design in gas chromatography. For liquid chromatography, however, it has never become very popular in practice. As early as in the 1980's, the theoretical framework for the assessment of open tubular column performance was developed. Unfortunately, preparative success could not keep up with it, due to a lack of efficient methods available for the deposition of a thick, homogeneous, covalently bonded and fully porous film at the inner wall of capillaries. Preparative publications in the 1990's offered promising plate counts, but the suitability for daily use was strongly constrained due to low retention or loadability of the columns obtained. Additionally, serious instrument limitations at that time emerged when handling nL/min-flow rates, coupled with detectability issues because of very small peak volumes eluting from the capillaries (modern LC instruments nowadays are very much more suitable).

By transferring the concept of the well-studied sol-gel-synthesis of silica monoliths (NAKANISHI-process) on confined spaces like 10-20  $\mu\text{m}$  ID-capillaries, a new static preparation protocol for the preparation of open tubulars could be developed. The physical background for this process implies the anomaly of the combination of phase separation and sol-gel-transition when it comes to confined structures as a reaction vessel. Instead of a three dimensional, coral-like and spatially undirected morphology of the resulting monolithic material (which would be generated in bulk medium), a layer is deposited alongside the containing surface. When this containing surface is the inner wall of a long (fused silica) capillary, the resulting, approximately 500 nm thick porous layer can be employed as a stationary phase in HPLC. Diameter-dependency of this effect could be shown by means of syntheses in 50, 20, 15 and 10  $\mu\text{m}$  ID-variants. Qualitative, structural properties such as layer thickness and its visual homogeneity were investigated by scanning electron microscopy of capillary cross-sections. Specific surface and mesoporosity were examined indirectly with the aid of nitrogen sorption experiments in bulk material of the same sol composition (approx. 200  $\text{m}^2/\text{g}$  and approx. 10 nm mean pore size diameter).

---

Resulting silica capillaries were employed as chromatographic columns for the separation of test mixtures and simple application examples of small molecules (approx. 100-500 g/mol) were developed in normal and reversed phase mode. The latter were established by a subsequent surface modification process (octadecylsilane) without endcapping by use of a monofunctional aminosilane reagent. Satisfying retention factors in reversed phase gradient mode were obtained in a (non-baseline-) separation of a mixture of 32 pesticides. Creation of a VAN DEEMTER-plot for the 15  $\mu\text{m}$  ID-variant resulted in a  $H_{\text{min}}$ -value of 18  $\mu\text{m}$  for propylbenzene. Regarding such a performance assessment by means of plate count per meter, open tubular capillaries are not able to compete in general as this method is strongly biased due to the negligence of column permeability. In comparison to both a particle packed and a monolithic commercial capillary (acting as reference columns), open tubulars from this work came up with a 600-fold decrease in flow resistance. Thus, only an alternative efficiency evaluation in terms of kinetic performance limitation (KPL)-plots, under consideration of column permeability, allowed for a truly fair comparison of column efficiency, as all tested capillaries are employed under optimized conditions, respectively. It involved a plot of the minimal analysis time, which is needed for the creation of a required plate count (kinetic plots). This approach is not very much prevalent throughout practical chromatographers as it required some iterative, such computer-based simulations for the creation of these plots. But in 2005, the DESMET group published a quite easy-to-use tool for the transformation of experimental  $H/u$ -data into  $t/N$ -pair of values. By doing so, the maximum column efficiency potential of the prepared open tubulars in this work was assessed and compared to the reference columns. The result is very much in line with what was predicted theoretically by other authors to be the expected efficiency gain of these columns. By use of the sol-gel-process in confined spaces developed herein for the creation of LC stationary phases, a new method for the reproducible deposition of silica thick films is available. For the smallest variant (10  $\mu\text{m}$  ID), the theoretical kinetic performance limit (maximal performance at the end of a given analysis time under optimized conditions) is already superior compared to the monolithic reference column. One important requirement for this is the utilization of the column at the (user set) pressure limit, which was 350 bar in this work. Fulfilling this requirement demands for a variable column length, which could be easily implemented by just cutting the open tubular capillary (no frits required) to the desired length (also possible for monolithic capillary formats). The central issue of deficient retention and hardly feasible loadability of previous, preparative methods for open tubular syntheses could be addressed beneficially by the new manufacturing protocol. Experimental confirmation of kinetic *in silico* optimization models in terms of column efficiency as well as the development of the involved synthesis procedure itself represent the main scientific gain of the work in hand.



---

## Inhaltsverzeichnis

---

Danksagung	i
Publikationsliste	ii
Zusammenfassung	iv
Summary	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
1. Allgemeiner Teil	1
1.1. Miniaturisierte HPLC-Systeme	1
1.2. Präparative Ansätze zur Herstellung von silica open tubular-Kapillaren	10
1.3. Bewertung chromatographischer Leistung mittels kinetischer Plots	17
2. Kumulativer Teil	26
2.1. Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography	28
2.2. Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography	36
2.3. Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10-20 micron open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography	44
2.4. Simple and fast quantification of capsaicinoids in hot sauces using monolithic silica capillaries and LC/MS	54
2.5. Qualitative LC-MS analysis of pesticides using monolithic silica capillaries and potential for assay of pesticides in kidney	60
2.6. Wie scharf ist "hot"? Analyse des Capsaicin-Gehalts in Chilisoßen	66
3. Ausblick	72
Literaturverzeichnis	74
Eidesstattliche Erklärung	80
Lebenslauf	84

---

## 1. Allgemeiner Teil

---

### 1.1. Miniaturisierte HPLC-Systeme

Seit ihrer Etablierung Mitte des 20. Jahrhunderts ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wesentlicher Bestandteil von Analytiklaboren der chemischen und pharmazeutischen Industrie geworden. Schon zu Ende der 1970er Jahre untersuchte J. KNOX die theoretischen Möglichkeiten zur Miniaturisierung von säulengebundenen, druckgetriebenen HPLC-Systemen [1]. Er unterschied dabei zwischen a) der Verkleinerung des Säulendurchmessers, b) dem Einsatz von (ebenfalls gepackten) Kapillaren als Säulenhardware sowie c) beschichteten, sehr dünnen Kapillaren, die nicht mit porösen Partikeln gepackt sein sollen (open tubular). Das zu dieser Zeit größte Hindernis für die Weiterentwicklung der genannten Formate lag in der geringen Verfügbarkeit geeigneter HPLC-Anlagen für Flussbereiche deutlich unter 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Während sich die Probenaufgabe von nL-Volumina noch durch Splitting-Systeme realisieren ließ, konnten die vom Kapillarauslass eluierenden Komponenten nicht mehr mit ausreichender Sensitivität durch zur Verfügung stehende UV-Detektoren ausgewertet werden. Die Meßzelle dieser Detektoren muss aufgrund der geringen Flussraten stark verkleinert sein, um den Beitrag von (post column-)Diffusion zur Bandenverbreiterung zu minimieren. Dies führt unweigerlich zu einer stark reduzierten (Licht-)Wegstrecke, welche sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz negativ proportional auf die gemessene Extinktion auswirkt (moderne nano-Zellen verwenden einen Z-ähnlichen Aufbau mit verlängerter Wegstrecke, um dieses Problem zu begrenzen). Neben diesen instrumentellen Beschränkungen wird auch die aufkommende Entwicklung neuer, hochempfindlicher Detektoren (Massenspektrometer, Lichtstreuung, Infrarotspektroskopie und weitere Kopplungstechniken) eine Notwendigkeit zur Miniaturisierung von HPLC-Systemen in den folgenden 1980er- und 1990er-Jahren verzögert haben [2].

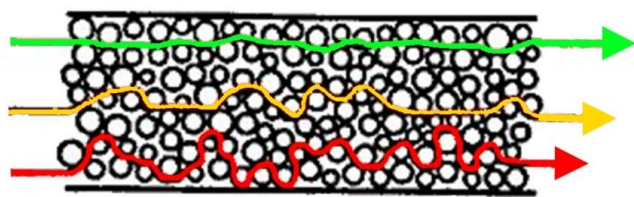
Der hauptsächliche Vorteil bei der Verwendung nicht-miniaturisierter HPLC-Säulengeometrien (4,6 mm Innendurchmesser, noch heute der Standard in der Routineanalytik) ist die Robustheit der zahlreich verfügbaren Instrumente, was zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Methoden führt. Dies ist besonders wichtig für validierte Prozesse in der industriellen, klinischen und behördlichen Analytik. Solange ausreichend Probenmaterial zur Verfügung steht - und damit das Injektionsvolumen nicht durch die Probenvorbereitung, sondern allein durch die Beladungskapazität der analytischen Säule begrenzt ist - wird eine Verkleinerung der Säulendimension keine Verbesserung der Detektorsensitivität bewirken (UV-Detektion). Wenn allerdings das maximale Injektionsvolumen applikationsbedingt begrenzt ist, wird unter Verwendung einer miniaturisierten HPLC-Säule/-Kapillare die Detektorsensitivität höher sein als unter Verwendung einer Standardsäule. Die Erklärung hierfür liegt in der geringeren diffusiven Verdünnung der Probenmoleküle innerhalb der mobilen Phase entlang der Trennstrecke [3]. Innerhalb moderner Forschungsfelder wie Proteomics, Forensics, Metabolomics, Single-cell analysis und weiteren Gebieten sind solche Applikationen unter

Umständen selbst nach aufwändigen Probenvorbereitungsprotokollen stark volumenlimitiert. In solchen Fällen ist die Verwendung eines miniaturisierten HPLC-Systems nicht mehr optional, sondern unausweichlich [2].

**Tabelle 1:** Übersicht kommerziell erhältlicher HPLC-Säulen mit typischem Innendurchmesser (ID) und korrespondierender Flussrate. Open tubular-Kapillaren (kursiv, nicht kommerziell verfügbar) im Vergleich dazu.

<b>Säulentyp/-name</b>	<b>Dimension (ID)</b> [mm]	<b>Typische Flussrate</b> [μL/min]
Analytical bore	4,6	500 – 1.500
Narrow bore	2,1	100 – 400
Microbore	1	50 – 100
Kapillaren	0,05 – 0,2	0,5 – 4,0
<i>Open tubular</i>	<i>0,005 – 0,015</i>	<i>0,01 – 0,20</i>

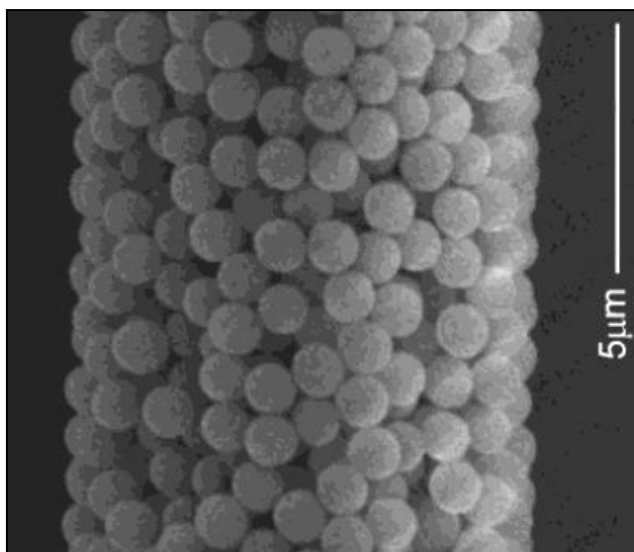
Zusätzlich zur Haupttriebfeder Probenlimitierung können weitere Vorteile beim Einsatz mikro- bis nanofluidischer Chromatographiesäulen identifiziert werden: Das benötigte Volumen an mobiler Phase korreliert quadratisch mit dem Säuleninnendurchmesser und kann einen wesentlichen Kostenfaktor darstellen (der Preis für Acetonitril (LC/MS-grade) liegt typischerweise bei über 50 €/L). Noch wichtiger ist die damit verbundene Umweltrelevanz („Green Chemistry“), welche eine Reduzierung des Einsatzes organischer Lösemittel auf ein Minimum vorsieht. Für die Kopplung von Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS), für die es heute zahlreiche Anwendungsgebiete gibt, wirkt sich eine verringerte Flussrate positiv auf die Ionisierungseffizienz aus (Electrospray Ionisation (ESI)). In der Ionenquelle werden kleinere Tropfen mit einem höheren Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis generiert, welches für die Verdampfung in die Gasphase vorteilhaft ist. Die optimale Flussrate typischer LC/MS-Applikationen liegt im Bereich von 20-400 nL/min [4]. Dieser Bereich wird durch die Verwendung von 4,6 mm-Säulen nicht erreicht, was zu einer stark reduzierten Signalintensität bei Verwendung dieser Säulentypen in LC/(ESI-)MS-Trennungen führt. Der jedoch ursprünglichste Grund zur Entwicklung kleinformatiger LC-Säulen ist damals wie heute von großer Bedeutung: Das Erreichen einer hohen Trenneffizienz, messbar durch die Zahl theoretischer Böden. Dabei ist der A-Term der zugrundeliegenden VAN DEEMTER-Gleichung (Eddy-Diffusion) abhängig vom Säulendurchmesser, da sich die möglichen Wegstrecken innerhalb einer Trennsäule für mehrere Moleküle derselben Substanz weniger unterscheiden, je kleiner der Querschnitt des Säulenbettes ist. Graphisch veranschaulicht ist dieser Beitrag zur Höhe eines theoretischen Bodens in der folgenden Abbildung 1:



**Abbildung 1:** Qualitative Veranschaulichung der Eddy-Diffusion in gepackten HPLC-Säulen. In grün, gelb, rot: Sich in ihrer Länge unterscheidende Wegstrecken von (identischen) Probenmolekülen bei druckgetriebener, longitudinaler Migration entlang der Trennstrecke (eigene Zeichnung).

### Gepackte Kapillaren

Das obige Modell gilt generell für alle Formen von stationären Phasen. Im Falle von mit Partikeln gepackten Kapillaren, welche die zurzeit häufigste Form von miniaturisierten Säulen darstellen, muss eine Verkleinerung des Säulendurchmessers jedoch nicht zwangsläufig zu einer verbesserten, chromatographischen Trennleistung führen. Denn eine Verringerung des Säulen-zu-Partikel-Verhältnisses (aspect ratio) kann zu einer unerwünschten Bandenverbreiterung aufgrund schlechter Packungsqualität sowie dem Auftreten von Wandeffekten führen [5]. Die Qualität gepackter Kapillaren hängt zu einem großen Teil von den verwendeten Packungsbedingungen ab. Schon 1969 hatten KNOX und PARCHER die Notwendigkeit beschrieben, den Partikeldurchmesser an einen verkleinerten Säulendurchmesser anpassen zu müssen, um das o.g. aspect ratio zu bewahren [6], allerdings wurden für ihre Untersuchungen unporöse Glaspartikel verwendet. 1989 untersuchten KENNEDY und JORGENSEN Packungen von porösen 5 µm-Silica-Partikel in 20-50 µm ID großen fused silica-Kapillaren [7]. Wie zu erwarten war, beobachteten sie einen Rückgang des VAN DEEMTER A-Terms (Eddy diffusion) und eine damit verbundene Steigerung der Trenneffizienz. Unterhalb eines kritischen Säulendurchmessers bewirkt der Wandeffekt zudem eine makroskopisch messbare Verringerung des Fließwiderstandes, was wiederum zu einer geringeren (und damit vorteilhaften) Trennimpedanz  $E_{min}$  führt. 2004 veröffentlichten PATEL *et al.* eine Machbarkeitsstudie zum Packen und Testen von 1 µm großen, unporösen Silica-Partikeln in einer 10 µm ID fused silica-Kapillare [8] unter Einsatz spezieller Ultrahochdruck-LC-Hardware (siehe Abbildung 2). Sie verwendeten einen eigens dafür entwickelten Hochdruck-Kapillaranschluss, welcher isokratische Tests bei bis zu 6.800 bar mit einer beeindruckenden Leistung von 730.000 Böden/m ermöglichte. Erzielt wurde dieser Wert unter isokratischen Bedingungen (90 % Wasser, 10 % Acetonitril) mit nahezu nicht retardierten Substanzen (Ascorbinsäure und Hydrochinon) im reversed phase (RP)-Modus. Nachteile dieses Formats sind die unzureichende Kapazität unporöser Partikel, die Notwendigkeit, besonders engporige Fritten nach dem Packvorgang *in situ* zu sintern (1 µm Partikel) sowie das Entstehen von Reibungswärme (friction heat) in gepackten Säulenbetten unter sehr hohem Druck. Durch die Verwendung von 10 µm ID-Kapillaren konnte letzteres Problem in der beschriebenen Arbeit auf ein Minimum reduziert werden, ist aber generell ein Problem beim Einsatz von z. B. „sub-2-micron“-Partikeln in der UHPLC (gepackt in 2,1 mm- und vor allem 4,6 mm-Säulen).



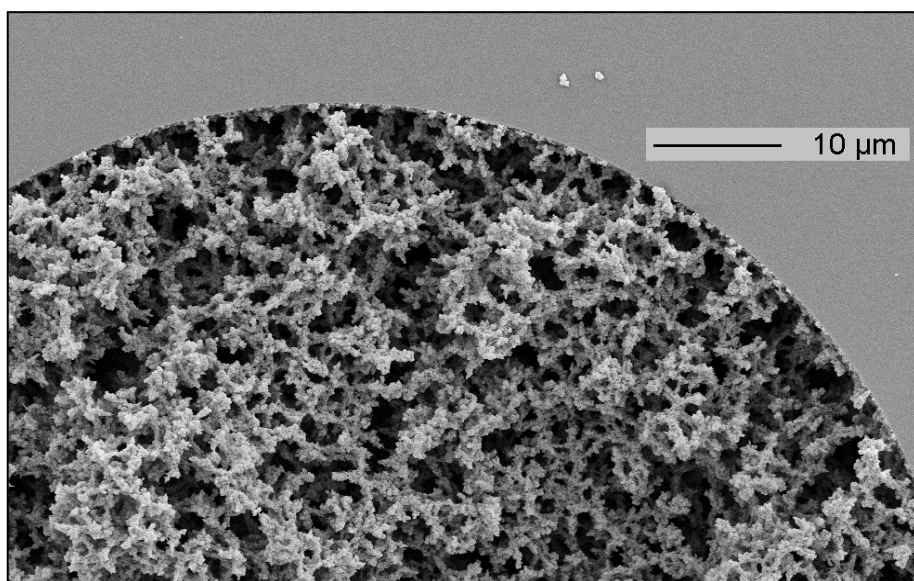
**Abbildung 2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Ultrahochdruckpackung von unporösen 1 µm ID-Silicapartikeln in einer 10 µm ID fused silica-Kapillare. Reprinted with permission from ref. [8], Copyright 2004 American Chemical Society.

### Monolithische Kapillaren

Ein großer Vorteil monolithischer Phasen in Kapillaren ist die vergleichsweise einfache Herstellung. Die Herstellverfahren beinhalten eine *in situ*-Synthese (die Reaktion findet direkt in der Kapillare statt), sodass kein Packprotokoll entwickelt werden muss. Da kovalente Bindungen zwischen dem Trägermaterial und der Kapillarinnenwand ausgebildet werden, kann auf den Einsatz von Fritten verzichtet werden. Aus diesem Grund ist die Säulenlänge von nicht-partikulären (monolithischen und open tubular-) Kapillaren nicht bereits herstellbedingt festgelegt. Dies kann von großem Vorteil bei der kinetischen Methodenoptimierung sein (siehe Kapitel 1.3). Silica-Monolithen wurden Mitte der 1990er-Jahre von TANAKA und NAKANISHI entwickelt [9] und um die Jahrtausendwende von Merck (KGaA, Darmstadt) als Chromolith®-Produktfamilie kommerzialisiert [10], zu der auch die miniaturisierte Kapillarvariante CapRod® zählt. Die Sol-Gel-Reaktion beruht auf einer kontrolliert-hydrolytischen Polykondensation von Silanolvorläufern wie Tetramethoxysilan (TMOS) unter leicht sauren Bedingungen, gefolgt von einer Mesoporenaufweitung im leicht basischen Milieu. Die resultierende, bimodale Porenstruktur des Silica-Gerüsts (Makroporen im Bereich 1-2 µm sowie Mesoporen im Bereich von ca. 10-30 nm) kann dabei über einen weiten Bereich durch den Einsatz eines Porogens wie Polyethylenoxid (PEO) eingestellt werden. Dies ist sowohl für größere Silica-Rods [11], als auch für die Porenstruktur in Kapillarmonolithen möglich [12]. Dabei ist eine Strukturheterogenität über den Kapillarquerschnitt zu beobachten, ebenso ein ausgeprägter Wandeffekt [13] (siehe Abbildung 3). Je nach Dimension des eingesetzten Kapillartemplats kann eine Mischung aus TMOS und Methyltrimethoxysilan (MTMS) vorteilhaft sein, um eine Schrumpfung des Gerüsts während des Herstellungsprozesses (und in Kapillaren die damit verbundene Gefahr der Wandablösung) zu minimieren [14]. Je kleiner der Kapillarinne Durchmesser ist, umso geringer ist diese Gefahr - für stark miniaturisierte Kapillaren (< 100 µm ID) wird daher bevorzugt reines

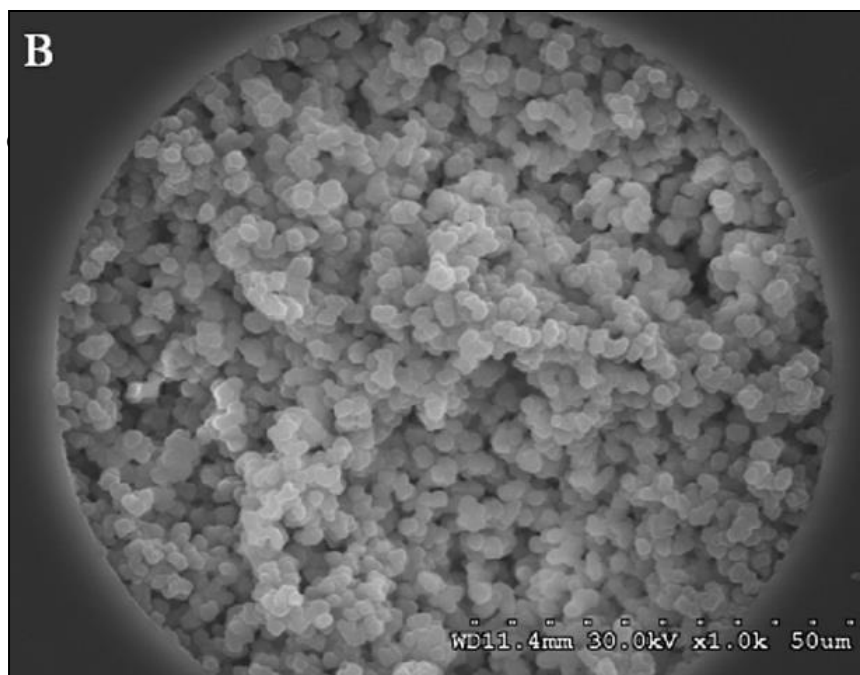


TMOS verwendet, um eine unnötige Heterogenität in der stationären Phase und eine damit verbundene Bandenverbreiterung zu vermeiden. Beeindruckende Ergebnisse wurden 2008 in einer Publikation der TANAKA-Gruppe beschrieben [15], in der mit einer 12 m langen, monolithischen Kapillare (100  $\mu\text{m}$  ID) eine (absolute) theoretische Bodenzahl von über 1.000.000 erreicht wurde (Retentionszeit: 150 min; Retentionsfaktor: 2,4). In 2011 verwendete die DESMET-Gruppe eine vergleichbare, 4 m lange Kapillare, welche in einem 22 h Gradienten zur Trennung und Identifizierung von über 1.000 verschiedenen, peptidischen Fragmenten aus dem tryptischen Verdau von Serumproteinen eingesetzt werden konnte [16]. Diese Beispiele (unter einigen anderen) für den Einsatz miniaturisierter Monolithe in fused silica-Kapillaren wurden dabei unter Verwendung kommerziell erhältlicher mikro- bzw. nano-LC-Instrumente durchgeführt.



**Abbildung 3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts der (Silica-)monolithischen Kapillare SF-087-6 (100  $\mu\text{m}$  ID, ca. 2  $\mu\text{m}$  Makropore, eigene Herstellung). Der Schnitt wurde mit einem Vytran-Cutter durchgeführt.

Die zweite große Klasse monolithischer HPLC-Materialien stellen stationäre Phasen basierend auf organischen Polymeren dar. Diese Technologie wurde bereits Anfang der 1990er Jahre von SVEC und FRÉCHET etabliert [17], die meisten Publikationen behandeln die thermische oder UV-initiierte *in situ*-Polymerisation von Methacrylaten oder Styrolderivaten. Das größte Anwendungspotential wird heute vor allem in der Separation von Biomolekülen gesehen [18] (analog zu der heutigen Dominanz pH-stabiler, polymerbasierter Trägermaterialien gegenüber Silica-basierten Phasen in der präparativen Biochromatographie). Einer der Gründe dafür liegt in der eher geringen spezifischen Oberfläche dieser Materialien (gering mesoporös). Für die Separation niedermolekularer Verbindungen („small molecules“) sind Silica-Monolithen daher aufgrund ihrer größeren Oberfläche gegenüber diesen Analyten bevorteilt, selbst größere Peptide ( $m/z > 1.000$ ) können noch mit hoher Auflösung getrennt werden [19].

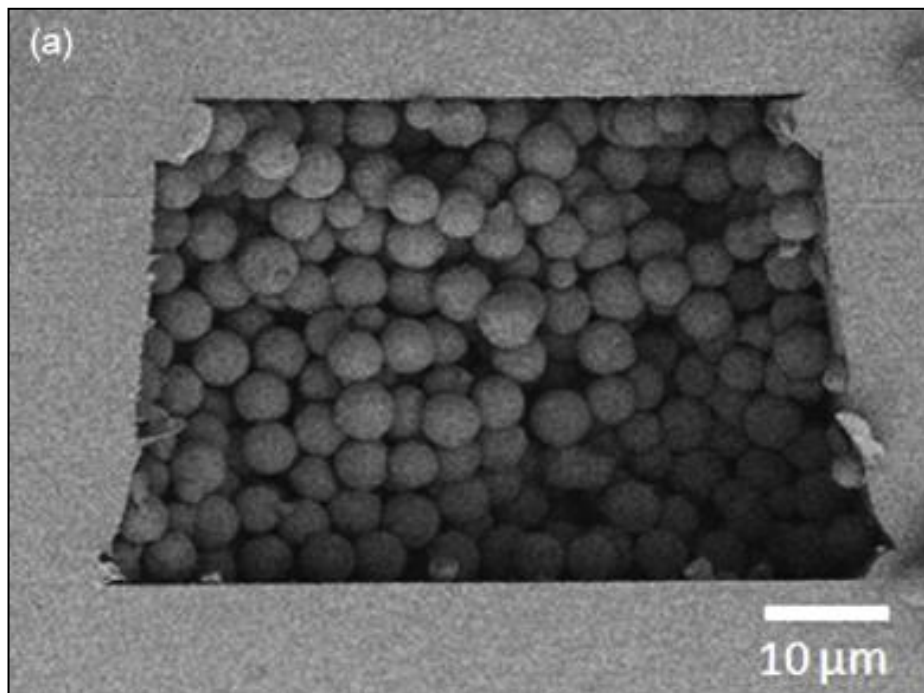


**Abbildung 4:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer polymermonolithischen Kapillare auf Basis von polymerisierten Methacrylatderivaten. Reprinted with permission from ref. [20]. Copyright 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

## Chips

In Verbindung der beiden Forschungsfelder „lab-on-a-chip“ und Mikrosystemtechnik haben moderne Materialformgebungsverfahren wie Photolithographie, Ionenätzverfahren und Laserablation in den letzten Jahren neue Möglichkeiten zur Fertigung mikrostrukturierter HPLC-Chips geschaffen [21]. Dieser Hardwaretyp kann als Alternative zu parallel entwickelten, miniaturisierten HPLC-Kapillaren verstanden werden, welche auf der Derivatisierung (Packungen, Monolithe, Beschichtungen) von kommerziell erhältlichen fused silica-Templaten beruhen. Auch im Bereich der Chips kann grundlegend zwischen gepackten, monolithischen und „nur“ chemisch modifizierten Varianten unterschieden werden. Das bekannteste, kommerzielle Produkt ist sicherlich der Agilent HPLC-Chip aus 2006, welcher mit partikulären Medien (meist RP-modifiziertes Silica) gepackt werden kann [22] (siehe Abbildung 5). Die Säulengeometrie ist dabei nicht zylindrisch ( $50\text{ }\mu\text{m} \times 75\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ mm}$ ), das Innenvolumen liegt bei knapp 200 nL. Das Säulenbett unterscheidet sich nicht grundlegend von partikulären Packungen in fused silica-Kapillaren (zylindrische Packungen sind häufig homogener), auf dem Chip selbst können jedoch weitere LC-Komponenten in ebenfalls miniaturisierter Form verbaut werden. So ist für verdünnte Proben die Injektion von nL-Volumina meist nur über Split-Lösungen des Autosamplers realisierbar, oder es ist eine aufwändige Probenkonzentration vorgeschaltet („trap columns“ oder offline). Auf dem HPLC-Chip kann dieser Schritt durch eine „on chip“-Probenkonzentration realisiert werden. Prinzipiell ist auch eine „on chip“-Detektion möglich, diese würde die notwendige und totvolumenanfällige Kapillarverbindung von nL-Flüssen (hier: ca. 300 nL/min) überflüssig machen. Der bevorzugte Detektor für chip-LC muss jedoch (wie eigentlich für alle

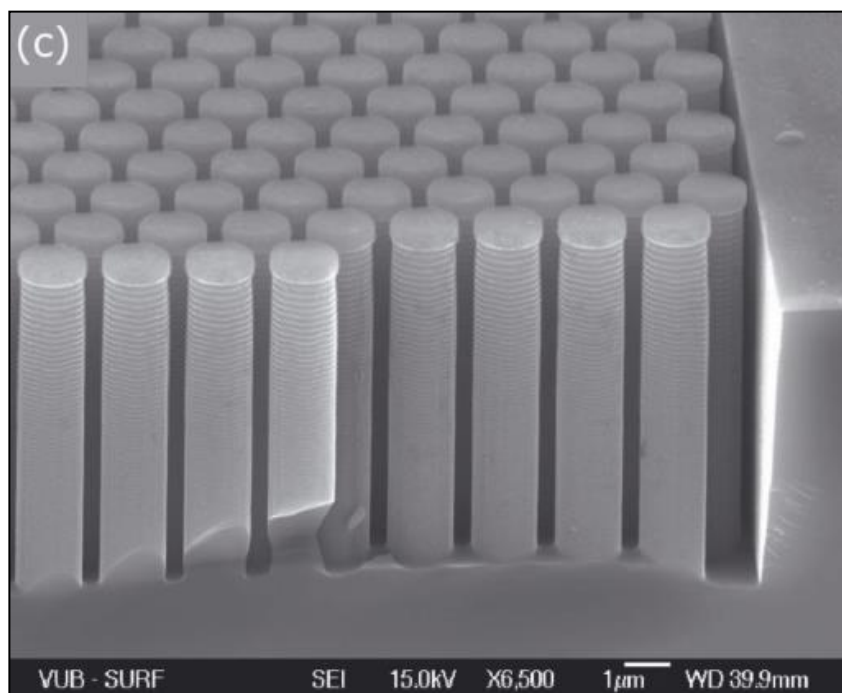
miniaturisierten Systeme) in Zukunft die hochauflösende, mehrdimensionale Massenspektrometrie ( $MS^n$ ) sein, um der Fragestellung probenlimitierter, anspruchsvoller „-omics“-Applikationen gerecht werden zu können. Die LC/MS-Kopplung mit chip-basierten Systemen stellt allerdings gerade eine der Stärken dieser Hardwareklasse dar, weil die Electrospray Ionisation-Emitterspitze ebenfalls bereits Teil des chips sein kann [23, 24].



**Abbildung 5:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Packung von 5 µm Zorbax-C<sub>18</sub>-Partikeln im 50 µm x 75 µm-Säulenbett des Agilent HPLC-chips (siehe Text). Reprinted with permission from ref. [24]. Copyright 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Neben chip-basierten Mikrokanälen mit partikulären (oder monolithischen), porösen stationären Phasen hat sich durch die Grundlagenforschung der DESMET-Gruppe eine neue Klasse stark miniaturisierter LC-Systeme ergeben. Durch die kombinierte Anwendung von UV-Photolithographie und Ionenätzverfahren auf einem unporösen Quarz-Substrat lassen sich unporöse, hochgeordnete dreidimensionale Porensysteme innerhalb eines quasi-zweidimensionalen Säulenbettes erstellen [25-29]. Vorteile dieser Technologie sind die hohe Reproduzierbarkeit der Fertigung (vor allem gegenüber monolithischen Synthesen) sowie die nahezu perfekte Anordnung der Säulen („pillar array“, siehe Abbildung 6), welches sich positiv auf die fluidodynamischen Eigenschaften und damit auf die chromatographische Leistung auswirkt [30]. Desweiteren kann der Abstand zwischen den einzelnen Säulen variabel angepasst werden, sodass die Permeabilität des Systems (Fließwiderstand) eine kontrollierbare Variable darstellt. Ein entscheidender Nachteil allerdings ist die unzureichende Kapazität aufgrund der geringen, weil unporösen Oberfläche.





**Abbildung 6:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mikrostrukturierten „pillar arrays“, gefertigt mittels UV-Photolithographie und Ionenätzverfahren aus einem Quarz-Substrat. Reprinted with permission from ref. [28]. Copyright 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA.

### Open tubular (OT)-Kapillaren:

Das größte Potential für den Einsatz hochauflösender OTs in der Flüssigchromatographie (in der GC ist dieser Kapillartyp heute Standard [31]) liegt in komplexen Viel-Komponenten-Trennproblemen, welche sich weniger durch minimale Analysenzeit, sondern mehr durch die Notwendigkeit extrem hoher Peakkapazitäten auszeichnen. Der hauptsächliche Grund für das hohe Leistungspotential ist der nahezu verschwindend geringe Beitrag der Eddy-Diffusion zur Höhe eines theoretischen Bodens (quasi-eindimensionale Trennstrecke) [32]. Aufgrund der im Vergleich zu gepackten und monolithischen Säulenbetten sehr viel größeren Makropore (Durchmesser ca. 9  $\mu\text{m}$  in einer 10  $\mu\text{m}$  ID fused silica Kapillare) ist die Permeabilität pro Längeneinheit hoch. Dies führt zu geringeren Minimalwerten der (die Säulenpermeabilität berücksichtigenden) Trennimpedanz  $E_{min}$  als mit den aktuellen sub-2-micron- sowie core-shell-Materialien erzielbar sind [2]. Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Kapillarvarianten (stationäre Phase bildet dreidimensionales Netzwerk über den Kapillarquerschnitt) ist die Miniaturisierung bei OTs keine Option zur Reduzierung der Eddy-Diffusion, sondern ein intrinsisches Merkmal dieses Säulentyps. Werden für gepackte und monolithische Varianten fused silica-Säulendurchmesser von 50-300  $\mu\text{m}$  eingesetzt, müssen es für OT-Synthesen weniger als 20  $\mu\text{m}$  sein. Der Grund hierfür liegt in der ansonsten zu dominanten Makropore, was bei nicht extrem langsamen Flussraten in einer Massentransferlimitierung der Analyten in der mobilen Phase resultieren würde. Typische Diffusionskoeffizienten in flüssiger und in der Gasphase unterscheiden sich entsprechend stark [33]. Dies ist ein bedeutender Unterschied zur Verwendung von OT-Kapillaren in der Gaschromatographie; dort werden Kapillardurchmesser

---

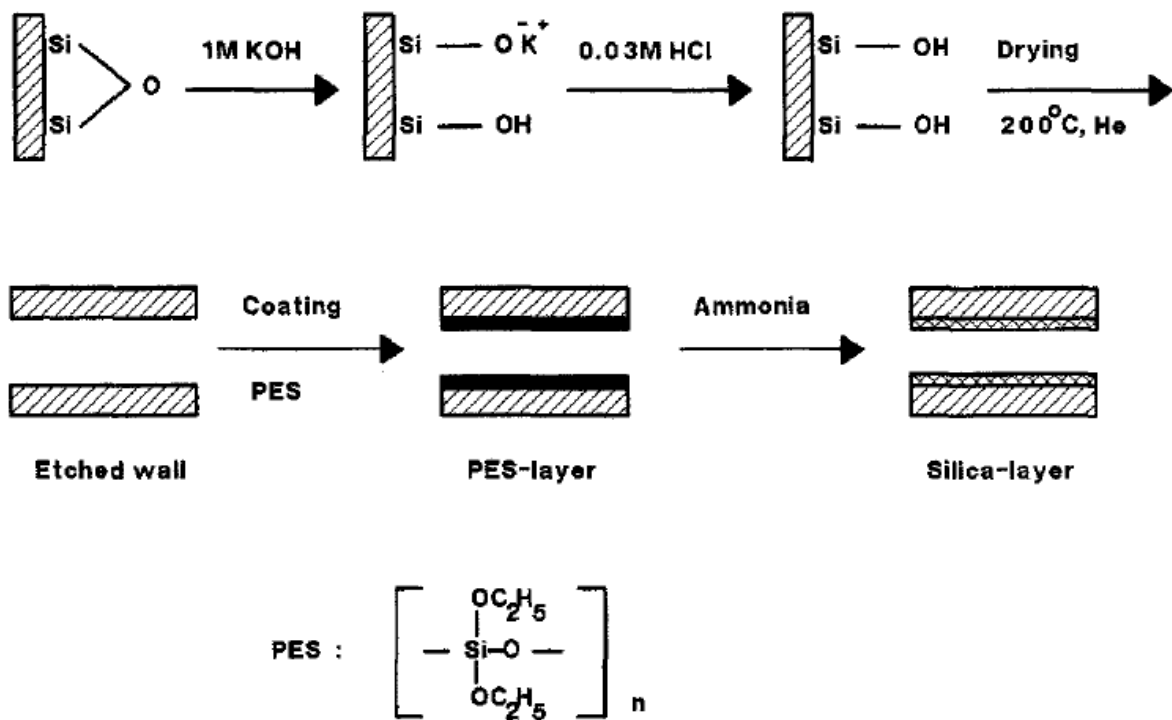
von bis zu 500  $\mu\text{m}$  eingesetzt bei deutlich erhöhter, linearer Geschwindigkeit der mobilen Phase (Trägergas). Aufgrund der hohen Temperaturen (Temperaturgradient) und der auch dadurch noch einmal höheren Diffusionsgeschwindigkeit ist in der GC kein dadurch erhöhter Beitrag der Massentransferlimitierung zur Bandenverbreiterung messbar. Aus diesem Grund ist für die Entwicklung von OTs für die Flüssigchromatographie das Verhältnis von Säulendurchmesser zu stationärer Phase (Dicke der Wandbeschichtung) von entscheidender Bedeutung. Umfangreiche, theoretische Berechnungen um 1980 [1, 33-42] und 1990 [43, 44] legten bereits einen optimalen Durchmesser im einstelligen  $\mu\text{m}$ -Bereich nahe. Die Arbeiten von CAUSON et al. aus 2011 allerdings berücksichtigen den Effekt dickerer Schichten stationärer Phase (aufgrund der Möglichkeit zur Synthese dieser) und erweitern den Bereich optimaler Performance auf ca. 10  $\mu\text{m}$  (kommerziell erhältliche Abmessung) [45]. Für die experimentelle Entwicklung geeigneter Herstellprozesse stellt dieser Durchmesser in etwa die kritische Größe bezüglich Machbarkeit und Reproduzierbarkeit dar. Die zuvor propagierte, optimale Querschnittsbreite von (Dünnschicht-)OTs durch GUIOCHON [35] beinhaltete als „Faustformel“ den maximal doppelten Durchmesser der als Vergleich betrachteten Partikelgröße einer Packung. Daraus resultierende (theoretische) OT-Kapillaren mit ca. 2-4  $\mu\text{m}$  Durchmesser sind nicht nur nahezu unmöglich herzustellen (eigene Erfahrung, nicht publiziert), sondern erfordern auch extreme, instrumentelle Anpassungen bezüglich der Injektions- und Detektionsmodule. Unter Einsatz einer 3  $\mu\text{m}$ -Kapillare wären die Peak-Elutionsvolumina bereits so klein, dass sie nicht mehr mit einer 1 nL-UV-Detektorzelle detektiert werden könnten [2] (die kleinste in dieser Arbeit verwendete Detektorzelle weist ein Zellvolumen von 3 nL auf). Ebenso würde die sorbensbedingt schon geringe Beladbarkeit (aufgrund sehr geringer Massen an stationärer Phase) bei fortschreitender Miniaturisierung unter die kritische Größe von ca. 5-10  $\mu\text{m}$  weiter abnehmen. In jeder Hinsicht positiv zu bewerten ist daher die Verfügbarkeit von neuen Herstellverfahren (siehe nächstes Kapitel), welche die Abscheidung und kovalente Bindung dickerer Schichten („thick films“, ca. 500 nm) porösen Materials an die Kapillareninnenwand erlauben. Für die Durchführung relevanter Applikationen muss (und kann) daher das Optimum aus maximal dünner Schicht und extrem kleinem Säulendurchmesser (Monolayer, höchste Leistung zu erwarten) in Richtung dickerer Schichten (bessere Beladbarkeit) und einer Kapillare um 5-10  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser verschoben werden.

---

## 1.2. Präparative Ansätze zur Herstellung von silica open tubular-Kapillaren

Wie im Kapitel zuvor bereits beschrieben, stellt das OT-Kapillardesign die maximale Form von HPLC-Säulenminiaturisierung dar, da anstelle eines makroporösen (partikulären oder monolithischen) Mediums der um die Wandbeschichtung reduzierte Kapillardurchmesser selbst als Durchflusskanal fungiert. Für die Applikation dieses Säulentyps auf relevante Trennprobleme ist die Dicke dieser stationären Phase von entscheidender Bedeutung für die Erzielung ausreichender Retentionsfaktoren. Die ersten Versuche zur C<sub>18</sub>-Monolayer-Funktionalisierung der Kapillarinnenwand [46] konnten daher aufgrund der fehlenden Porosität und damit zu geringen chromatographischen Oberfläche nicht erfolgsversprechend sein [47]. Das Verhältnis von Kapillarquerschnitt zur Dicke der stationären Phase („phase ratio“) darf für hinreichende Retentionseigenschaften nicht zu groß sein. Die einzige Möglichkeit, dies zu erreichen, stellt daher die Immobilisierung eines stabilen, porösen Films dar, welcher die Kapillarinnenwand vollständig bedeckt. Je höher die Filmdicke ist, umso größere Kapillaren können verwendet werden (bei gleichem phase ratio), was sich positiv auf die instrumentellen Probleme bei der Herstellung, aber vor allem auf Injektions- und Detektionslimitierungen auswirkt. Beim Einbringen geeigneter Synthesegemische kann grundsätzlich zwischen dynamischen und statischen Prozessen unterschieden werden. Dynamische Protokolle beinhalten eine kontinuierliche Abscheidung während eines über einen längeren Zeitraum durchgeführten Einpumpprozesses. Dem Vorteil einfacher (schneller) Handhabung und damit guter Reproduzierbarkeit steht als Nachteil die Abscheidung nur sehr geringer Schichtdicken gegenüber. Statische Protokolle sehen nach dem Befüllvorgang eine Inkubation ohne Fluss vor, in der die Deposition des porösen Materials (oder dessen Vorläufer) an die Kapillarinnenwand stattfindet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Protokolle (siehe kumulativer Teil) sind dieser Klasse zuzuordnen. Nach ebenfalls Oberflächen-limitierten Versuchen zur Aufrauung der fused silica-Wand durch dynamische Vorbehandlungsprotokolle in stark alkalischem Medium [48] entwickelte die POPPE-Gruppe in den 1990er-Jahren eine statische Methode zur Immobilisierung von Polyethoxysilan (PES) aus Tetraethoxysilan (TEOS) in 10 µm ID fused silica-Kapillaren [49]. Dafür wurde die Beschichtungssuspension (bestehend aus zuvor hergestellten PES-Partikeln, solubilisiert in polaren, organischen Lösemitteln) in die vorbehandelte Kapillare eingebracht und ein unpolares, organisches Lösemittel zugegeben, bis schließlich PES-Partikel ausfielen. Diese wurden durch Verdampfung des Lösemittels im Vakuum kovalent an der Kapillarinnenwand immobilisiert (2-3 Tage). Eine Porenaufweitung wurde durch Verwendung von Ammoniak (pH 8-11) durchgeführt. Dieser Syntheseprozess konnte mehrfach wiederholt werden, bevor eine Oberflächenfunktionalisierung (C<sub>18</sub>) aufgebracht wurde oder die Kapillaren ohne Modifizierung in der Normalphasenchromatographie getestet wurden. Die Autoren berichteten von höheren Schichtdicken gegenüber den (zuvor verwendeten) dynamischen Methoden. Ein Problem in der Herstellung war die Gefahr der Kapillarblockierung durch unkontrollierte Bildung von Silica aufgrund „frühzeitiger“ Aggregation der solubilisierten PES-Partikel. Die Löslichkeit dieser Partikel (und damit die Wahl des Lösemittels) hatten einen entscheidenden Einfluss auf die

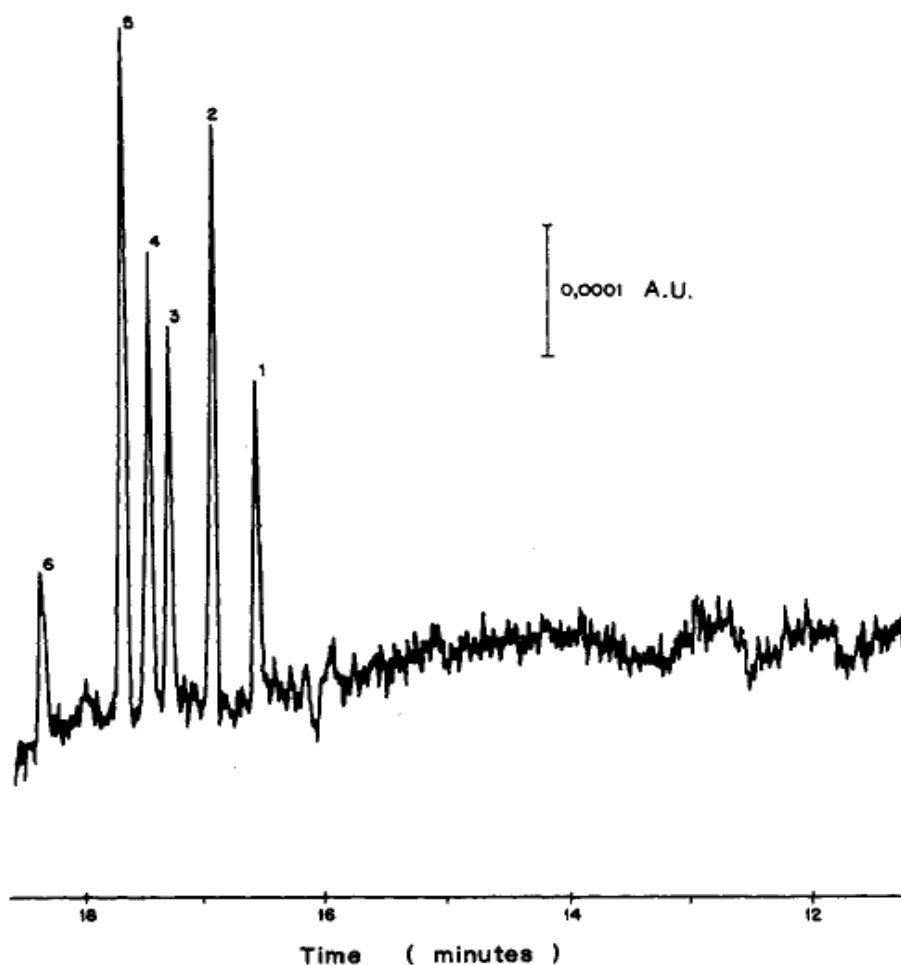
Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Je löslicher PES im Befüllmedium war, desto schneller reicherte sich abgeschiedenes Silica über den gesamten Querschnitt der Kapillare an und führte somit zur Verstopfung des Flusskanals. Das Lösemittel musste daher gerade stark genug für die Solubilisierung sein, jedoch durfte die Konzentration von PES nicht zu hoch sein. Leider wurden keine bildgebenden Verfahren eingesetzt, sodass auch keine Schichtdicken veröffentlicht wurden. Neben den experimentellen Schwierigkeiten der Methode berichten die Autoren außerdem von einer weiterhin unzureichenden Retention aufgrund zu geringer Schichtdicken.



**Abbildung 7:** Skizzierte Darstellung des Herstellverfahrens zur statischen Beschichtung von zuvor hergestellten Polyethoxysilan(PES)-Partikeln (solubilisiert in polar-organischen Lösemitteln) in fused silica-Kapillaren nach POPPE. Oben: Kapillarvorbehandlung zur Erhöhung der Hydrophilie (freie Silanolgruppen). Mitte: Zweistufiges Beschichtungsverfahren bestehend aus a) Immobilisierung der PES-Partikel (zuvor hergestellt aus Tetraethoxysilan (TEOS) und b) Porenaufweitung durch Ammoniaklösung (pH 8-11). Unten: Monomereinheit des Silica-Polymers aus TEOS. Reprinted with permission from ref. [49], Copyright 1989 Elsevier.

Die nächste Stufe in der Entwicklung poröser Silica-Schichten für open tubular-Kapillaren wurde 1993 von CREGO *et al.* veröffentlicht [50]. Sie verwendeten eine *in situ*-Polymerisation von TEOS in Ethanol direkt in der Kapillare. Das Protokoll wurde für 50 µm ID-Kapillaren entwickelt, konnte aber sukzessive auf kleinere Formate bis zu 5 µm ID adaptiert werden. Die Silanhydrolyse wurde entweder durch Zugabe von Salzsäure (pH 3) oder Ammoniumhydroxid (pH 9) katalysiert. Die Inkubationszeit dieser statischen Methode betrug zwischen 6 und 16 h bei erhöhter Temperatur, eine Mesoporenaufweitung nach erfolgter Silica-Deposition erfolgte nicht. Resultierende Schichtdicken wurden indirekt über Druckverlustmessungen und die

Anwendung des Darcy-Gesetzes ermittelt (die Schichtdicke entspricht der Subtraktion der Werte vor und nach der Beschichtung). Der Fehler dieser Methode wurde mit  $\pm 30$  nm angegeben, die (In)homogenität der Oberfläche (zusätzliche Reibungsverluste) konnte jedoch nicht berücksichtigt werden. In 10  $\mu\text{m}$ -Kapillaren wurden so Schichtdicken von 210 bis 720 nm gemessen, wobei einige Kapillaren keine Permeabilität aufgrund aggregierter Silica-Partikel aufwiesen (5 und 10  $\mu\text{m}$  ID). Bildgebende Verfahren zur Ermittlung der Schichtdicke wurden auch hier nicht eingesetzt. Die Autoren testeten die erhaltenen Kapillaren im RP-Modus (nach  $\text{C}_{18}$ -Funktionalisierung der Oberfläche) und berichteten von hoher Trennleistung, jedoch sehr geringer Retention und Beladbarkeit (siehe Signalintensität in Abbildung 8). Beide Beobachtungen lassen sich auf die unzureichende Porosität des Silica zurückführen.



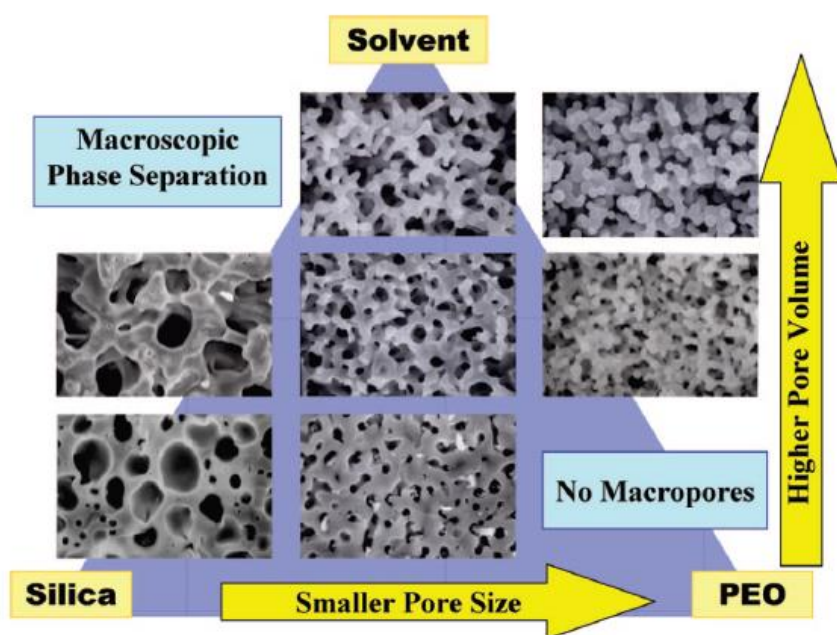
**Abbildung 8:** RP-Chromatogramm der Trennung polyaromatischer, polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (Naphthalen, Biphenyl, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren) mit einer 5  $\mu\text{m}$  ID, 120 cm langen fused silica open tubular-Kapillare, hergestellt nach dem statischen Verfahren von CREGO *et al.* Mobile Phase: Wasser/Methanol 30/70, Flussrate: 3 nL/min (split), Druck: 27 bar, Injektionsvolumen: 10 pL (split). Reprinted with permission from ref. [50], Copyright 1993 American Chemical Society.

In einer Abwandlung der obigen Sol-Gel-Methode (TEOS in Ethanol) haben GUO und COLÓN zu Ende der 1990er-Jahre Mischungen aus TEOS und  $\text{C}_8$ -/ $\text{C}_{18}$ -TEOS als Silica-Monomer eingesetzt [51-56]. Auf diese Weise etablierten sie eine *in situ*-Alkylierung der porösen

Oberfläche, ohne einen nachgeschalteten Derivatisierungsschritt durchführen zu müssen. Die verbleibenden freien Silanolgruppen würden zu Tailing basischer Analyten im druckgetriebenen RP-Modus führen, die Autoren nutzten die erhaltenen Kapillaren jedoch überwiegend für elektrochromatographische Trennungen (immobilisierte Ladungsträger sind wichtig für den Erhalt des elektroosmotischen Flusses). Strukturbedingt unterlag auch diese Kapillargeneration dem Problem zu geringer Retention bzw. Beladbarkeit.

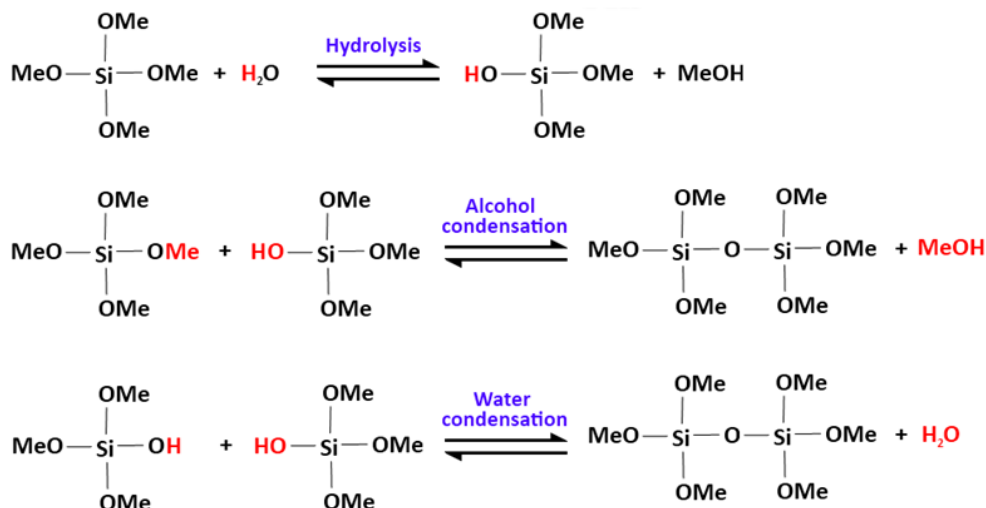
#### Der NAKANISHI-Prozess in miniaturisierten Templaten

Die Synthese bimodaler (makro- und mesoporöser), korallenartiger Silica-Monolithen aus katalytisch hydrolysierbaren Precursoren wie Tetramethoxysilan (TMOS) unter Einfluss eines strukturgebenden Porogens wie Polyethylenoxid (PEO) wird auch als NAKANISHI-Prozess bezeichnet [57-59]. Ein Dreikomponentensystem, bestehend aus Precursor, Porogen und Lösemittel, wird in einem solchen Verhältnis eingesetzt, dass aufgrund der eintretenden Oligomerisierung eine Phasenseparation (Silica-„reich“ und Silica-„arm“) auftritt, welche wiederum durch das Eintreten des Sol-Gel-Übergangs in einem transienten Zustand fixiert wird (siehe Abbildung 9). Dies geschieht aufgrund der zunehmenden Viskosität durch die sukzessiv fortschreitende Polymerisation der hydrolysierten Mono- und Oligomere. Nach Inkubation bei erhöhter Temperatur (Alterung) wird das Zweiphasensystem durch fortschreitende Siloxanbrückenbildung fixiert. Verdampfung der Silica-„armen“ bzw. Lösemittel-„reichen“ Phase führt zu einem hierarchisch porösen System aus Silica, welches aufgrund seiner Mesoporesität als stationäre Phase in der analytischen und präparativen HPLC kommerziell eingesetzt werden kann [60, 61].



**Abbildung 9:** Dreikomponentensystem im NAKANISHI-Prozess zur templatunterstützten Bildung von hierarchisch porösen Silica-Monolithen. Zu sehen ist die qualitative Abhängigkeit der ausgebildeten (Makro-)Struktur von den eingesetzten Massenanteilen in der Synthesemischung (Silica-Precursor, Porogen (PEO) und Lösemittel). Reprinted with permission from ref. [57], Copyright 2007 American Chemical Society.

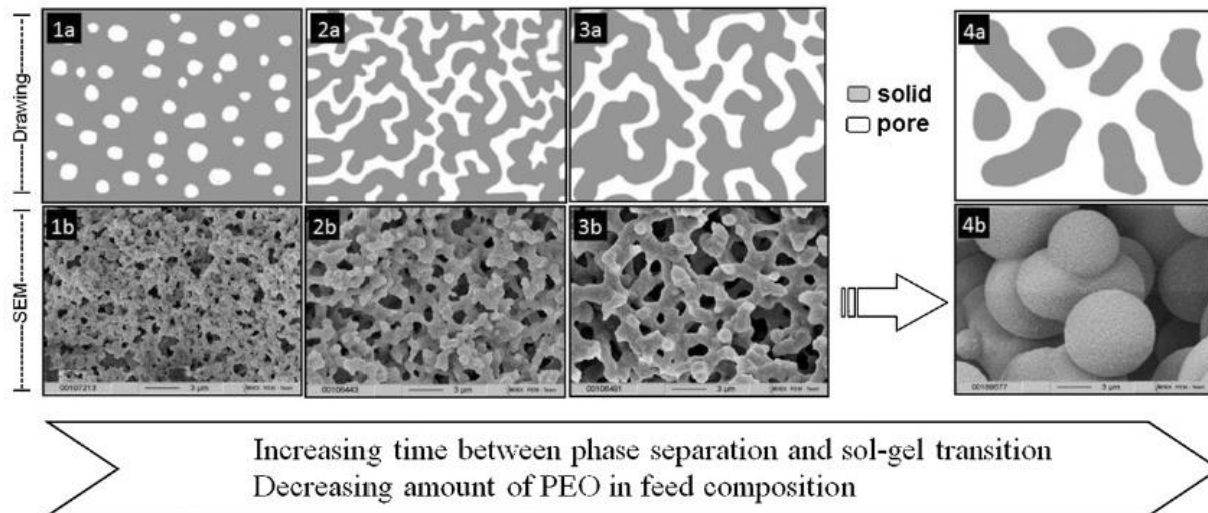




**Abbildung 10:** Skizziertes Syntheschema der katalytisch kontrollierten Hydrolyse und anschließenden Polymerisation von Tetramethoxysilan; Oben: Hydrolyse des Monomers (sauer oder basisch) unter Abspaltung von Methanol. Mitte: Oligomerisierung (Alkoholkondensation); Unten: Oligomerisierung zweier hydrolysierter Spezies (Wasserkondensation).

Das oben beschriebene Syntheseprinzip findet in der Regel in einem mikroskopisch nicht begrenzten, dreidimensionalen Reaktionsraum statt. Ein möglicher Einfluss des Reaktionsmedium begrenzenden Materials (zumeist Glas) kann daher vernachlässigt werden. Wird die Reaktionsmischung allerdings in ein engwandiges Templat gegeben („confined space“), dessen Wand-zu-Volumen-Verhältnis um ein Vielfaches höher ist (im Vergleich zu einem Reaktionsgefäß für bulk-Monolithen), kann der Wandeffekt einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur des phasenseparierenden Systems haben. Ein solches Templat kann u.a. der Zwischenraum zweier Objektträger sein oder eine sehr kleine fused silica Kapillare (2-15  $\mu\text{m}$  ID) mit einem quasi-eindimensionalen Reaktionsraum und einem extrem hohen Wandeffekt. KANAMORI *et al.* haben den Effekt der Templatgeometrie auf die Ausbildung von (Silica-)Monolithen in den letzten Jahren sehr detailliert untersucht [62-67]. Während der Phasenseparation tritt ein die Wand benetzender Prozess ein („surface directed spinodal decomposition mechanism“ [68]), in welchem die Silica-reiche Phase bevorzugt die begrenzende Wand bedeckt. Durch Diffusion aus dem bikontinuierlichen (Wand-entfernten) Bereich des Reaktionsraumes wird die Wand-benetzende Phase über die Dauer der Reaktion weiter verstärkt („hydrodynamic pumping“). Abhängig von der Dimension des Raumes (unterhalb eines kritischen Durchmessers der fused silica-Kapillare) entsteht als Resultat nach Beendigung des Herstellprotokolls (Alterung, Waschschrift, Verdampfung) kein dreidimensionales Netzwerk, sondern eine dicke („thick film“) poröse Silica-Schicht, welche die Kapillarinnenwand homogen ausfüllt. Im Gegensatz zur nicht templat-kontrollierten, klassischen Monolith-Synthese wird die Ausbildung der hierarchisch porösen Skelettstruktur aufgrund der oben beschriebenen Prozesse vollständig zugunsten der Wandschichtausbildung unterdrückt. Bei Verwendung von fused silica-Kapillaren als Templat liegt der kritische Kapillardurchmesser vermutlich zwischen 15 und 20  $\mu\text{m}$  (eigene Synthesen, [69]). Bei

Verwendung größerer Durchmesser sind nach Beendigung des Syntheseprotokolls neben der Wandschicht auch aggregierte Silica-Partikel im Kapillarrinnen zu finden (Rasterelektronenmikroskopie), welche aufgrund der Gravitation den Kapillarboden bedecken. Diese agglomerierten Partikel entsprechen im NAKANISHI-Prozess einer sehr großen Makropore. So groß, dass kein verzweigtes Porensystem mehr entsteht, sondern die Silica-reiche Phase zum Zeitpunkt der transienten Fixierung (Sol-Gel-Übergang) eine nicht mehr zusammenhängende „Partikel“-ähnliche Struktur einnimmt (siehe Abbildung 11), welche aufgrund der folgenden Alterung zu einem Block aggregiert.

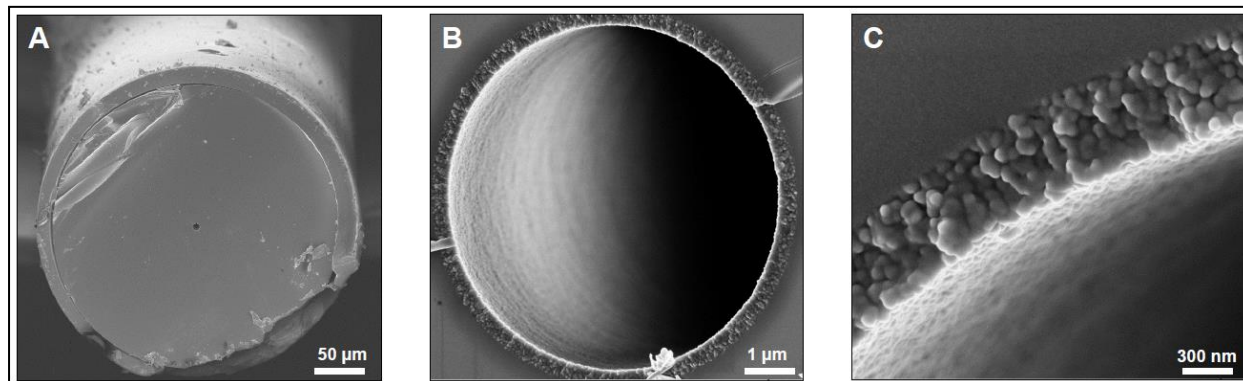


**Abbildung 11:** Oben: Schematische Zeichnung der Phasenseparation im NAKANISHI-Prozess, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der transienten Fixierung durch den Sol-Gel-Übergang (gesteuert durch die Zusammensetzung des Synthesegemisches). Unten: Korrespondierende Rasterelektronenmikroskopiebilder. Der Pfeil am unteren Ende der Abbildung stellt die Entwicklung von isolierten Poren (links) hin zu komplett verbundenen Poren (rechts) dar. Dies entspricht der Bildung von isolierten Silica-Partikeln (eigene Zeichnung aus ref. [69]).

Über die Zusammensetzung des eingesetzten Sols sowie über die Wahl der Reaktionstemperatur lässt sich die Morphologie des resultierenden Materials entlang der Zeichnung in obiger Abbildung in einem weiten Bereich einstellen. Um eine dicke, homogene Schicht entlang der Kapillarwand zu erhalten, muss aufgrund des weiter oben beschriebenen Mechanismus die Zeit zwischen Phasenseparation und Sol-Gel-Übergang maximiert werden (nur dann kann über das „hydrodynamic pumping“ die Wand-benetzende Schicht über einen langen Zeitraum aus der Phase in der Kapillarmitte diffusiv aufgebaut werden). Eine Erhöhung des Porogenanteils führt generell zur Entstehung kleinerer Makroporen, verursacht durch frühzeitiges Einsetzen des Sol-Gel-Übergangs relativ zur Phasenseparation (in der Abbildung links) [70]. Daher wurde das Dreikomponentensystem in der vorliegenden Arbeit stark zugunsten der Silica- und Lösemittelanteile verschoben (rechts). Eine weitere Modifikation gegenüber der „bulk“-Synthese von korallenartigen Silica-Monolithen (mittig) stellt die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 25 °C dar (ausgehend von meist ca. 40 °C). Auf diese Weise wird die Löslichkeit der oligomerisierenden Polysiloxankette erniedrigt, was vermutlich zu einer früher einsetzenden Phasenseparation führt. Durch die beiden genannten Modifikationen war es



möglich, die Zeit zwischen Phasenseparation und Gelübergang zu maximieren. Im „bulk“ führt dies zu einer Struktur wie in Abbildung 11 rechts unten, in einer sehr kleinen Kapillare (confined space) wird diese Struktur jedoch aufgrund der beschriebenen Effekte zugunsten der Wandschicht unterdrückt.



**Abbildung 12:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 10 µm ID-Kapillare aus eigener Herstellung (SF-OT-063). A: Gesamtkapillarquerschnitt mit 365 µm Außendurchmesser fused silica Kapillarkopf mit Polyimid-Ummantelung; B: Querschnitt des 10 µm ID Flusskanals mit immobilisierter Silica stationärer Phase (ca. 500 nm Dicke); C: Nahaufnahme der porösen Wandschicht unter maximaler Vergrößerung.

Durch die Adaption des gut etablierten NAKANISHI-Prozesses für die templat-gestützte Synthese von dicken, porösen stationären Phasen für open tubular-Kapillaren konnten diese erfolgreich als neuer, miniaturisierter Säulentyp in der HPLC eingesetzt werden [69, 71, 97]. Gegenüber zuvor publizierten Herstellverfahren weisen diese Säulen verbesserte, chromatographische Eigenschaften auf. Die exakten experimentellen Parameter sind in den Veröffentlichungen im kumulativen Teil der vorliegenden Dissertation beschrieben.

#### Porous Layer Open Tubular (PLOT)-Kapillaren

Die Synthesen und auch der aktuelle Stand der Wissenschaft, beschrieben in dieser Arbeit, beschränken sich auf die Entwicklung Silica-basierter Materialien. In den letzten Jahren haben vor allem die Gruppen um KARGER [72-76] und PAULL [77, 78] das Spektrum polymerbasierter open tubular-Kapillaren (PLOT) für Proteintrennungen erweitert. Den Arbeiten liegen ebenfalls Monolithen-Synthesen zugrunde, jedoch basierend auf der UV- (oder thermisch) initiierten Polymerisation von Styrol- oder Methacrylatderivaten. Die veröffentlichten Applikationen sind zumeist Gradiententrennungen in Kombination mit Massenspektrometrie (cap-LC/MS). Dieses Gebiet wird im allgemeinen Teil der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt.

---

### 1.3. Bewertung chromatographischer Leistung mittels kinetischer Plots

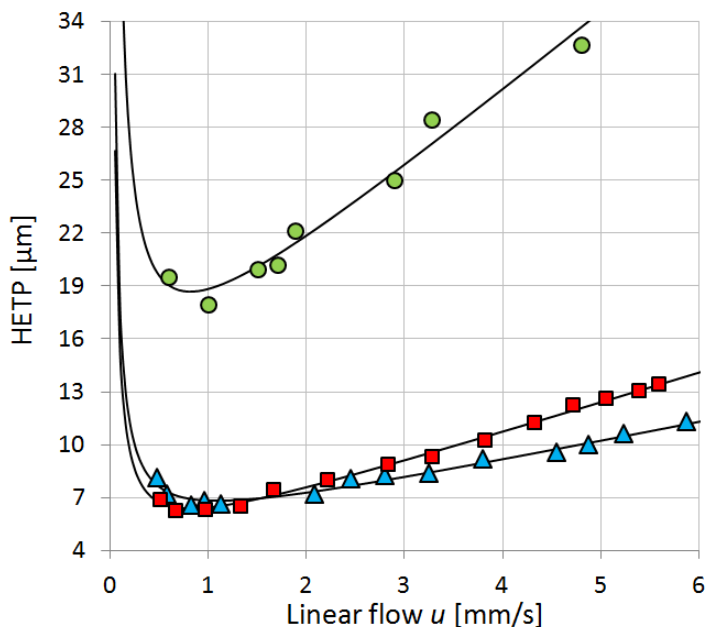
Das ultimative Ziel jeder Trennoptimierung ist das Erreichen maximaler Trenneffizienz in der kürzest möglichen Analysenzeit (eine ausreichende Selektivität der Trennsäule für die untersuchten Komponenten vorausgesetzt). Zur Steigerung der chromatographischen Leistung, also der Zahl theoretischer Böden, kann zum einen durch eine längere Säule die Trennstrecke erhöht werden. Zum anderen kann die „domain size“ verkleinert werden, im Falle gepackter Säulen/Kapillaren entspricht dies der Partikelgröße plus Partikelzwischenraum (Monolithen: Summe aus durchschnittlicher Makropore und durchschnittlicher Skelettdicke; OT: Kapillarinneindurchmesser). Beide Veränderungen führen bei ansonsten unveränderten Parametern zwangsläufig zu einer Erniedrigung der Permeabilität und damit zu einem erhöhten Rückdruck. Die Säulenlänge  $L$  ist mit der Zahl theoretischer Böden  $N$  nach VAN DEEMTER verknüpft über die Höhe eines theoretischen Bodens:  $H = L/N$ . In der heute noch als Standard verwendeten Auftragung aus der Originalarbeit von 1956 [79] wird diese Bodenhöhe  $H$  definiert über die grundlegende VAN DEEMTER-Gleichung:

$$H = A(d_p) + \frac{B}{u_0} + C(d_p^2)u_0 \quad (1)$$

$A$  beschreibt die Eddy-Diffusion in Abhängigkeit von Art und (Packungs-)Qualität der stationären Phase ( $d_p$ : Partikeldurchmesser); Der  $B$ -Term beschreibt die Longitudinaldiffusion aufgrund BROWN'scher Molekularbewegung und ist damit flussabhängig ( $u_0$ : lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase);  $C$  beschreibt den Beitrag von Massentransferlimitierung (sowohl in der mobilen als auch in der stationären Phase) zur Bodenhöhe.

Aufgrund der oben beschriebenen Abhängigkeiten kann die Auftragung des Höhenäquivalents eines theoretischen Bodens (height equivalent to a theoretical plate, HETP) gegen die lineare Flussrate  $u_0$  zur Beurteilung der Trenneffizienz einer untersuchten Säule oder Kapillare herangezogen werden (siehe VAN DEEMTER-Plot, Abbildung 13). Alle auf diese Weise verglichenen Trennsäulen zeigen, bedingt durch Gleichung (1), in der Auftragung ein Minimum  $H_{min}$ , welches als Charakteristikum für die maximale Trennleistung des Längenäquivalents (pro Meter) eines vorliegenden Trennmediums unter optimalen Bedingungen verstanden und verwendet werden kann. Liefert eine 15 cm lange Säule beispielsweise 100.000  $TP/m$  für einen Analyten und wird für ein spezifisches Trennproblem um diesen Analyten eine Bodenzahl von ca. 30.000  $TP$  benötigt, wird erst der Wechsel auf eine 30 cm lange Säule diese gewünschte Leistung bieten. Eine Beschreibung chromatographischer Trenneffizienz mithilfe dieser Auftragung ist generell sinnvoll, da sie experimentell relativ leicht zugänglich ist und die Interpretation aufgrund der weiten Verbreitung vor allem in der Industrie leicht fällt. Ein sehr wichtiger Parameter bleibt auf diese Weise jedoch nicht berücksichtigt: Die Permeabilität des vorliegenden Materials. Solange partikuläre Packungen sowie moderne, monolithische Medien miteinander verglichen werden, bleibt die Dimension des Druckverlusts pro Längeneinheit (Permeabilität) in etwa gleich. Die open tubular-

Kapillaren aus der vorliegenden Arbeit jedoch weisen eine bis zu 600-fach höhere Permeabilität auf ( $k_0$  ca.  $6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$ ), bei Kapillarlängen von mehreren Metern [71]. Der Vorteil, aufgrund dieser Eigenschaft die Trennstrecke bei gleicher Analysenzeit sehr viel länger gestalten zu können wird durch den Vergleich mittels VAN DEEMTER-Auftragung ignoriert. Leistung pro Längeneinheit ( $TP/\text{m}$ ) stellt daher nur dann eine faire Beurteilungsmethode dar, wenn die Abhängigkeit des Rückdrucks von der Säulenlänge der untersuchten Medien sehr ähnlich ist. Dies ist nur innerhalb eines Typs stationärer Phase der Fall. Moderne sub-2-micron und core-shell-HPLC-Säulen sind in der Regel zwar in verschiedenen Säulenlängen kommerziell verfügbar (ca. 50-300 mm) und variieren daher durchaus im resultierenden Rückdruck (bei gleicher Flussrate natürlich) - ihre Permeabilität unterscheidet sich jedoch vergleichsweise nur gering [80]. In der untenstehenden Abbildung 13 ist die Überlegenheit der beiden 15 cm-Referenzkapillaren (partikelgepackt und monolithisch,  $H_{min}$  ca.  $6\text{-}7\mu\text{m}$ ) gegenüber der untersuchten 3,0 m langen OT-Kapillare ( $H_{min}$  ca.  $18\mu\text{m}$ ) deutlich erkennbar.

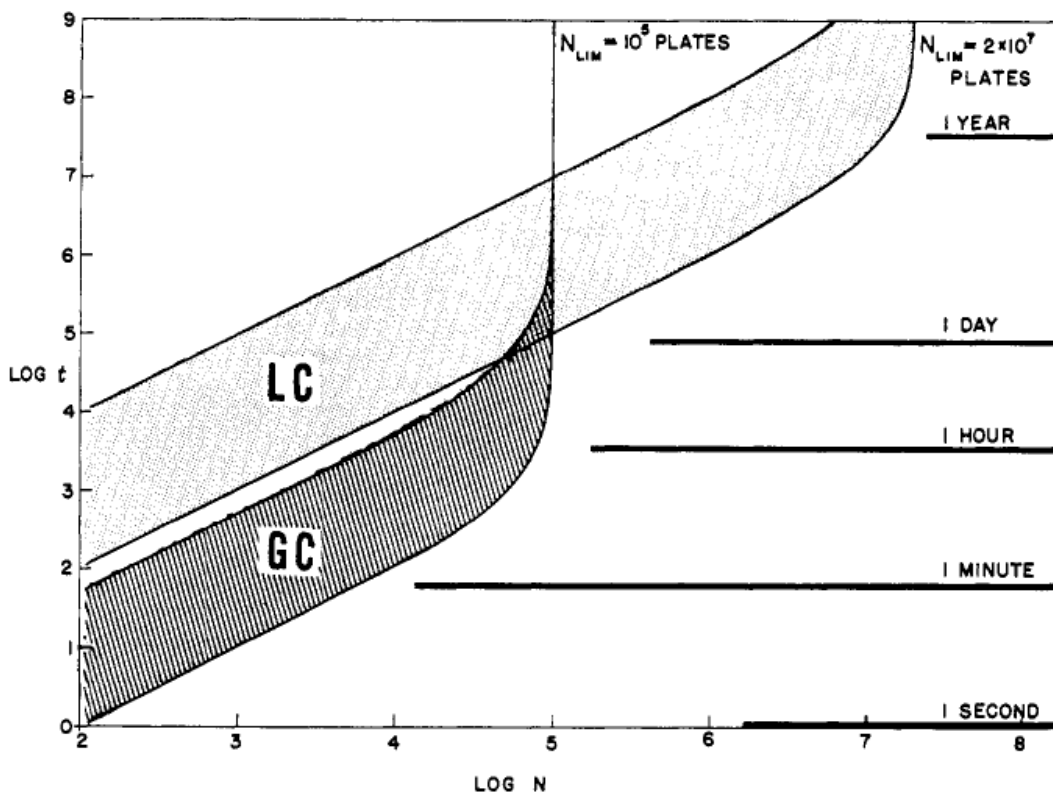


**Abbildung 13:** Klassische VAN DEEMTER-Auftragung zur Ermittlung der optimalen Geschwindigkeit der mobilen Phase (der minimalen Bodenhöhe  $HETP_{min}$ ). Grüne Kreise: 3,0 m lange open tubular-Kapillare mit  $15\mu\text{m}$  ID, RP-8-modifiziert (SF-OT-039). Rote Rechtecke: Kommerzielle Vergleichskapillare 1: 15 cm lange mit Partikeln gepackte ( $3\mu\text{m}$ ) RP-18-modifizierte  $75\mu\text{m}$  ID-Kapillare (ThermoFisher Scientific). Blaue Dreiecke: Kommerzielle Vergleichskapillare 2: 15 cm lange, monolithische, RP-18-modifizierte  $100\mu\text{m}$  ID-Kapillare (Merck KGaA). Untersucher Analyt: Propylbenzol,  $k = 0,3$ .

Ein alternativer Ansatz zur Bewertung chromatographischer Leistung ist die Ermittlung der minimalen Analysenzeit, welche zum Erreichen einer (durch das Trennproblem) gegebenen Bodenzahl benötigt wird (kinetische Optimierung [81]). Das Prinzip dieses Optimierungsansatzes beinhaltet die freie Wählbarkeit von Flussrate und Länge der Trennstrecke. Erstere wird vor allem durch das zur Verfügung stehende Instrument begrenzt, mit modernen UHPLC-Geräten können Drücke bis 1.400 bar und mehr realisiert werden. Die Säulenlänge jedoch ist im Falle gepackter (und daher Fritten benötigender) Edelstahlsäulen

herstellerseitig vorgegeben (die einzige Möglichkeit zur Einstellung dieses Parameters ist in diesem Fall natürlich der Ersatz der Säule durch ein längeres Pendant desselben Typs bzw. die Säulenkopplung). Im Falle von monolithischen und open tubular-Kapillaren ist es jedoch sehr einfach möglich, ausgehend von einem längeren Kapillarstück die Trennstrecke spezifisch für das vorliegende Separationsproblem zurechtzuschneiden und somit zu optimieren.

Schon 1965 veröffentlichte J. C. GIDDINGS den ersten „kinetischen Plot“, als er die fundamentalen Unterschiede in der Trenngeschwindigkeit zwischen Gas- und Flüssigchromatographie darstellen wollte [82] (siehe Abbildung 14). In dieser Auftragung ist die minimale Analysenzeit zu sehen, die jeweils nötig ist, um eine korrespondierende Bodenzahl erreichen zu können. Die Werte wurden für den Betrieb am (festzulegenden) Druckmaximum berechnet (bei dafür notwendiger, variabler Säulenlänge). Auch wenn die Analysenzeiten (und ebenso Bodenzahlen) in diesem Originaldiagramm aufgrund der logarithmischen Auftragung von typischen HPLC-Methoden recht weit entfernt sind, zeigt der kinetische Plot im Gegensatz zu einer (nicht gezeigten) VAN DEEMTER-Auftragung doch klar die grundlegenden Leistungsunterschiede zwischen Säulen für die LC (Trennstrecke eher kurz) und GC (Trennstrecke eher lang). Der Grund dafür liegt in der, bedingt durch die niedrigere Viskosität eines Trägergases als mobiler Phase, vielfach höheren Permeabilität von GC-Kapillaren.



**Abbildung 14:** Erster kinetischer Plot (aus GIDDINGS' Originalarbeit von 1965) zur Beschreibung des Verhältnisses von Analysenzeit  $t$  zu Trennleistung  $N$ . Reprinted with permission from ref. [82], Copyright 1965 American Chemical Society.

HANS POPPE entwickelte 1997 eine alternative Auftragung, in welcher er die minimale Analysenzeit  $t$ , geteilt durch die Bodenzahl  $N$ , gegen  $N$  plottete [83], heute bekannt als der „POPPE-Plot“. Auf diese Weise konnten Unterschiede von Säulentypen im C-Term-dominierten Bereich (Massentransferlimitierung) besser dargestellt werden. Allen genannten Methoden zur Konstruktion kinetischer Plots lag eine iterative, computerbasierte Vorgehensweise zugrunde. Erst 2005 entwickelten GERT DESMET *et al.* eine Methode zur Transferierung experimenteller  $H/u$ -Wertepaare (Ergebnis chromatographischer Tests bei unterschiedlichen Flussraten) in  $t/N$ -Wertepaare zur Auftragung in einem kinetischen Plot [84, 85]. Neben der experimentellen Erfassung von Bodenhöhen  $N$  in Abhängigkeit der linearen Flussrate  $u$  muss dabei zusätzlich die Permeabilität  $k_0$  nach dem DARCY-Gesetz bestimmt werden:

$$k_0 = \frac{u \cdot \eta \cdot l}{\Delta p} \quad (2)$$

$\eta$  ist dabei die dynamische Viskosität der mobilen Phase,  $\Delta p$  die gemessene Druckdifferenz und  $l$  die Säulenlänge. Die zur Berechnung von  $t/N$ -Wertepaaren zugrundeliegenden Gleichungen lauten:

$$t = \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \left( \frac{k_0}{u^2} \right) (1 + k) \quad (3)$$

$$N = \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \left( \frac{k_0}{uH} \right) \left( \frac{k}{1 + k} \right)^2 \quad (4)$$

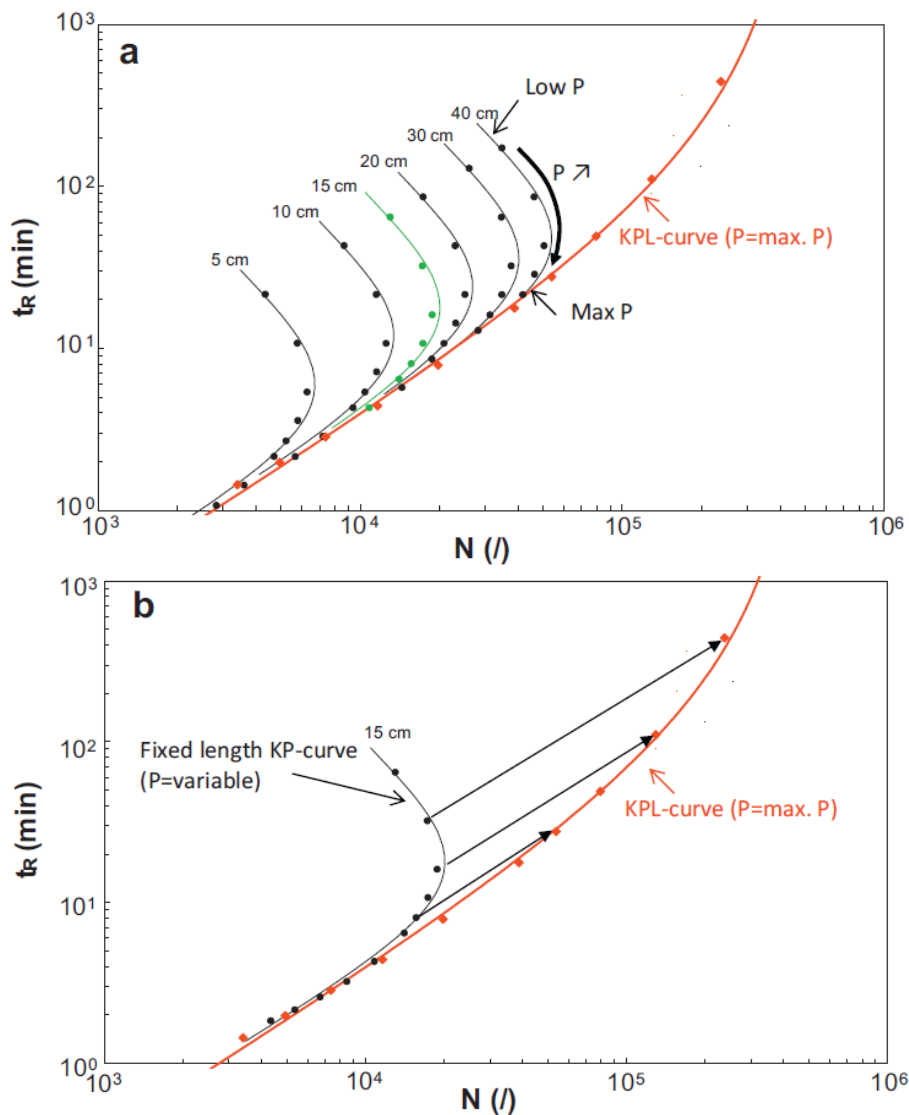
$\Delta p_{\max}$  muss zuvor festgelegt werden ( $k$ : Retentionsfaktor). Wie bereits beschrieben, ergibt sich dieser Wert zumeist aus dem Drucklimit der zur Verfügung stehenden Chromatographieanlage. Für drucklimitierte HPLC-Säulen, wie z. B. Monolithe in 2,0 mm und 4,6 mm Durchmessern, sollte dieser materialbezogene Wert verwendet werden. Im Falle von fused silica-Kapillaren (kein Gewinde) kann eine apparativ noch realisierbare Drucklimitierung sinnvoll sein, diese hängt vor allem von der Qualität der verwendeten Fittings beim Kapillaranschluss sowie der Erfahrung des Experimentators ab (vgl. Kapitel 3.1 im zweiten Paper des kumulativen Teils). Auf diese Weise generierte, kinetische Plots haben heute in vielen Veröffentlichungen Verwendung gefunden, eine aktuelle Übersicht geben BROECKHOVEN *et al.* [86]. Das kinetische Optimum ist definitionsgemäß genau dann erreicht, wenn das vorgegebene Trennziel (Peakkapazität oder Bodenzahl) in der minimal nötigen Zeit erreicht wurde. Oder auch, wenn die maximal mögliche Performance am Ende einer vorgegebenen Analysenzeit zur Verfügung steht. Dies ist, in beiden Fällen, immer nur genau dann der Fall, wenn die Säulenlänge gerade so groß ist, dass die Trennung am (vorgegebenen) Drucklimit stattfindet [87, 88]. Dieses Prinzip kann als nicht intuitiv betrachtet werden, da der aktuelle Trend hin zu kürzeren Säulen dieser Tatsache (jedenfalls für komplexe Trennungen) im Wege steht. Es ist aber durchaus möglich, für ein spezifisches Trennproblem durch Erhöhung der Säulenlänge und kinetischen Optimierung eine Verringerung der Analysenzeit zu bewirken.



---

### Kinetic plot limitation (KPL)

Man kann unterscheiden zwischen „fixed-length“-kinetischen Plots und „free-length“-kinetischen Plots. Erstere entsprechen den experimentellen Labormessungen ( $H/u$ ) mit einer installierten Säule gegebener Länge. Das Optimum (in der  $t/N$ -Auftragung nach rechts, siehe Abbildung 15) kann analog zum Minimum der VAN DEEMTER-Kurve gesehen werden (nach unten, vgl. Abbildung 13). Das kinetische Optimum (für jede fixe Säulenlänge betrachtet), befindet sich allerdings nicht an diesem Punkt, sondern, wie zuvor beschrieben, immer am Drucklimit, d. h. am unteren Ende aller „fixed-length“-Plots in Abbildung 15a („Max P“). Zur praktischen Konstruktion des KPL-Plots, welcher die allgemeingültigste Form zur Darstellung kinetischer Leistung von Chromatographiesäulen darstellt, gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen können Hochdruck-Messpunkte vieler verschiedener Säulenlängen des untersuchten Materials via „free-length“-Plots in das  $t/N$ -Diagramm übernommen werden und im Anschluss alle Messwerte am Drucklimit miteinander verbunden werden (graphische Lösung, Abbildung 15a). Die zweite, elegantere Möglichkeit besteht in der Aufnahme von Messpunkten einer installierten Säule in einem größeren Druckbereich und der anschließenden Anwendung der Gleichungen (3) und (4) auf diese experimentellen Messwerte (rechnerische Lösung, Abbildung 15b). In beiden Fällen entsteht eine (hier rote) identische KPL-Kurve, welche die maximal mögliche Performance des vorliegenden Materials zur gegebenen Analysenzeit beschreibt. Es ist daher nicht möglich, durch Neukombination der Parameter Flussrate/Säulenlänge in den Bereich unterhalb dieser Linie zu gelangen (KPL: „kinetic plot limitation“). Alle Punkte dieser rechnerischen Linie stellen jeweils das kinetische Optimum dar, welches bei Anpassung der Säulenlänge experimentell genutzt werden kann. Natürlich gilt dies nur unter Beibehaltung weiterer chromatographischer Parameter wie Art und Zusammensetzung der mobilen Phase, Temperatur, Säulendurchmesser, Injektions- und Detektionsparameter, und weiteren instrumentellen Variablen. Für die Erstellung einer LC-Methode würde ohnehin zunächst eine Selektivitätsoptimierung durchgeführt werden (Säulenscreening) und im Anschluss die kinetische Optimierung zur Minimierung der Analysenzeit. Durch Auflösen von Gleichung (3) oder (4) nach  $k_0$  und Einsetzen in Gleichung (2) kann die optimale Säulenlänge  $l$  am Ende einer solchen, spezifischen Methodenentwicklung bestimmt werden. Diese hier beschriebene Methode zur KPL-Konstruktion gilt in dieser Form nur für isokratische Tests (wie sie auch für VAN DEEMTER-Messungen ausschließlich erfolgen), kann jedoch durch Adaption der Gleichungen auf die abweichende Bodenzahlbestimmung im Gradientenmodus auch für solche Trennungen angepasst werden [86]. OT-Säulencharakterisierungen (kinetische Plots) aus der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich im isokratischen Modus unter Verwendung der obigen Gleichungen durchgeführt.

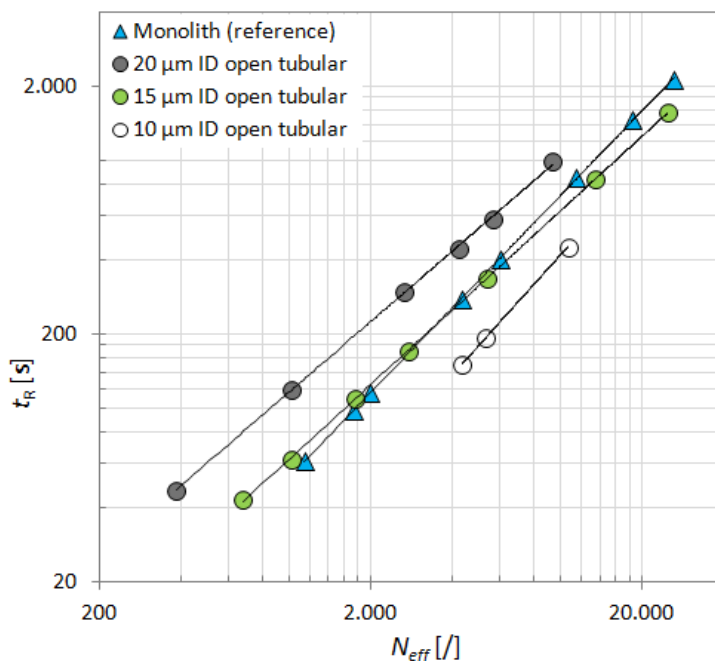


**Abbildung 15:** Transformationen experimenteller kinetischer Plots („fixed length“) in einen „free length kinetic plot“ nach der DESMET-Methode [84]. Die rote Linie stellt das Ergebnis der Transformation dar (KPL: „kinetic plot limitation“, Interpretation siehe Text); a) Erste Möglichkeit zur graphischen Konstruktion der KPL-Linie durch Verbinden von Punkten verschiedener Säulenlänge, gemessen jeweils am Drucklimit (instrumentell oder materialbedingt); b) Zweite Möglichkeit zur rechnerischen Konstruktion der KPL-Linie durch experimentelle Aufnahme von  $H/u$ -Wertepaaren und anschließender Transformation in  $t/N$ -Wertepaare mithilfe der Gleichungen (3) und (4). KPL-Kurven in a) und b) sind identisch. Reprinted with permission from ref [86], Copyright 2012 Elsevier.

### Vergleich von VAN DEEMTER-Messungen mit KPL-Kurven für OT-Kapillaren

Zu Beginn dieses Kapitels wurde anhand der Auftragung von experimentellen  $H/u$ -Daten (Abbildung 13) das Längenäquivalent eines theoretischen Bodens einer 3,0 m langen OT-Kapillare bestimmt und mit kommerziellen, 15 cm langen Referenzkapillaren verglichen. Dabei wurde die scheinbare Überlegenheit der gepackten und monolithischen Standardkapillaren sichtbar - bezogen auf die (dafür unzureichende) Leistungsbewertung pro Längeneinheit. Erst unter Berücksichtigung der erhöhten Permeabilität des open tubular-Säulendesigns, durch Erstellung eines KPL-Plots, kann eine faire Bewertung der (maximal) zur Verfügung stehenden Trenneffizienz der untersuchten stationären Phasen-Klassen stattfinden. Die auf diese Weise

generierten Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit entsprechen den theoretischen Vorhersagen iterativer, nicht experimentell bestätigter Veröffentlichungen. Die Abhängigkeit der KPL-Linie vom (OT-)Kapillardurchmesser konnte ebenfalls experimentell bestätigt werden. Abbildung 17 zeigt zusammengefasst das chromatographische Leistungspotential verschiedener, hier synthetisierter OT-Dimensionen, optimiert nach der KPL-Methode, und verglichen mit einer kommerziell erhältlichen, monolithischen Referenzkapillare (150 mm Länge, 100  $\mu\text{m}$  ID). Ausgewertet wurden isokratische Bodenzahlbestimmungen von einem leicht retardierten Analyten (2-Nitroanisol,  $k = 0,7$ ) im Normalphase-Modus. Dabei ist zu beobachten, dass nur die 10  $\mu\text{m}$  ID-Variante eine KPL-Kennlinie unterhalb der monolithischen Referenz bietet. Dies entspricht exakt den Ergebnissen der theoretischen Arbeit von TIM CAUSON, in welcher der optimale Kapillardurchmesser im Falle einer erfolgreichen „thick film“-Synthese auf bis zu ca. 10  $\mu\text{m}$  angehoben werden kann [45]. Die Ergebnisse mit Varianten von 15  $\mu\text{m}$  ID liegen in etwa gleichauf mit der Trennleistung von kommerziellen Kapillaren. 20  $\mu\text{m}$  ID-Varianten zeigen in diesem Fall ein geringeres, kinetisches Optimum. Diese experimentellen Ergebnisse sind im Einklang mit der in Kapitel 1.1 beschriebenen Diffusionslimitierung großformatiger OT-Kapillaren im C-Term-dominierten Bereich. Hohe Bodenzahlen sind zwar möglich, aufgrund der höheren Masse an stationärer Phase können auch die Retentionsfaktoren höher sein (nicht publiziert), jedoch wären dafür nötige Flussraten impraktikabel niedrig, sodass das Verhältnis von Analysenzeit zu Trennleistung (kinetische Plots) wiederum sehr unvorteilhaft ist. In einer VAN DEEMTER-Auftragung verschiedener OT-Säulendimensionen (10, 15, 20  $\mu\text{m}$  ID, nicht gezeigt) würde die 20  $\mu\text{m}$ -Variante das geringste Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens aufweisen (bei kaum realisierbaren Flussraten und einem Druck von ca. 1 bar).



**Abbildung 16:** Kinetic performance limitation (KPL)-Plot verschiedener open tubular-Kapillardimensionen, synthetisiert in dieser Arbeit. Die Berechnung der  $t/N$ -Wertepaare erfolgte nach der Methode von GERT DESMET [84]. Zum Vergleich ist die ebenfalls experimentelle KPL-Linie einer kommerziellen, monolithischen Referenzkapillare gezeigt (blaue Dreiecke). Alle Bodenzahlbestimmungen wurden mit dem Analyten 2-Nitroanisol ( $k = 0,7$ ) unter isokratischen Bedingungen im Normalphase-Modus durchgeführt.







---

## 2. Kumulativer Teil

---

Der kumulative Teil dieser Dissertation besteht aus den folgenden Veröffentlichungen:

- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2012, 1265, 88-94.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2013, 1283, 110-115.
- Simon Forster, Harald Kolmar, Stephan Altmaier, "*Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10-20 micron open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography*", J. Chromatogr. A 2013, 1315, 127-134.
- Simon Forster, Stephan Altmaier, "*Simple and fast quantification of capsaicinoids in hot sauces using monolithic silica capillaries and LC/MS*", LCGC North America 2013, 31, 218-223. (Cover article)  
Zweitveröffentlichung des Artikels: LCGC Europe, 2013, 26, 326-329.
- Simon Forster, Stephan Altmaier, "*Qualitative LC-MS analysis of pesticides utilizing monolithic silica capillaries and potential for assay of pesticides in kidney*", LCGC Europe Sep. 2013, 488-497.
- Simon Forster, Stephan Altmaier, „Wie scharf ist "hot"? – Analyse des Capsaicin-Gehalts in Chilisoßen“, labor&more 2012, 4, 64-68.



---

## 2.1. Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography

### Authors:

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b</sup>

### Institutions:

<sup>a</sup>Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>b</sup>Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

### Bibliographic data:

Journal of Chromatography A, 2012, 1265, 88-94

DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.054

Received: August 06, 2012

Received in revised form: September 14, 2012

Accepted: September 18, 2012

Published online: September 29, 2012

### Keywords:

Open tubular capillaries

Silica stationary phase

Sol-gel chemistry

Confined space

Nano-LC

### Short summary:

Description of sol-gel-synthesis and investigation of silica structure morphology in bulk (nitrogen sorption) and inside the capillary (SEM). Applicability in chromatography demonstrated by two separation examples.

### Link:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312014665>

Reproduced by permission of Elsevier



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

# Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography<sup>☆</sup>

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany<sup>b</sup> Merck KGaA, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 6 August 2012

Received in revised form

14 September 2012

Accepted 18 September 2012

Available online 29 September 2012

### Keywords:

Open tubular capillaries

Silica stationary phase

Sol–gel chemistry

Confined space

Nano-LC

## ABSTRACT

The chromatographic performance gain of open tubular (OT) silica capillaries over packed beds has been demonstrated theoretically. However, experimental progress in the preparative realization of these columns is still lacking behind as thick films are required for a sufficient mass loadability. Here, silica sol–gel chemistry in confined spaces was applied to the preparation of thick-film OT capillaries comprising a mesoporous layer with a thickness of approximately 500 nm covalently attached to the capillary wall. Samples were synthesized varying both in length and inner diameter (ID) and the resulting layer morphology was investigated using scanning electron microscopy. The chromatographic performance of these first generation columns was evaluated by normal phase chromatography utilizing standard capillary-LC equipment. Separations of small molecules in a 15  $\mu$ m ID column provided high theoretical plate numbers (up to 170,000) and a good retention capacity within reasonable retention times (<1 h), bearing the unavoidable trade-off between column efficiency and analysis time.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

After open tubular (OT) columns were established in gas chromatography (GC) [1], they are today routinely used due to the dramatic improvement in column efficiency. Tsuda et al. [2] first discussed the utilization of this kind of stationary phase for liquid chromatography (LC), which lead to numerous publications [2–8] concerning design, properties and calculated performance gain compared to packed bed columns [9,10]. However, in contrast to OT capillaries employed in GC, column IDs in LC have to be up to  $10^2$ – $10^3$  times smaller to gain comparable efficiencies. Diffusion coefficients of solutes in the liquid and stationary phase are significantly reduced and lead to a large contribution of mass transfer to the van-Deemter-equation [11,12]. As a major benefit of decreasing column ID, the high permeability of OT columns and therefore small influence of convective dispersion [13] allows for the application of longer columns with standard HPLC equipment. This setup results in an improved peak capacity. For simulated separations requiring high theoretical plate values, the open tubular format in principle provides a faster separation or higher resolution within the

same analysis time [14]. While these comparisons have been carried out some 30 years ago, Causon et al. recently published a paper [15] with state-of-the-art prediction models, taking into account a thick-film layer and comparing the theoretical kinetic column performance with up-to-date particle technology. They pointed out, that a porous silica OT column with an ID as large as 5  $\mu$ m will be superior to packed columns in terms of kinetic performance (with a gain factor of 8), considering a simulated separation requiring >100,000 theoretical plates.

In the past, a major drawback for the development and application of narrow OT columns has been the chromatographic instrumentation limitation in terms of injection and detection devices [16]. This resulted in a performance falling far short of what has been predicted theoretically [14]. Nowadays, commercially available nano-flow LC instruments and the sensitivity of mass spectrometry or nano-cell UV detection allow for further downsizing of column dimensions.

Several preparation strategies for the covalent deposition of a thick-film porous silica layer onto the inner wall of a fused silica capillary have been published. The choice of silica versus polymeric supports should be advantageous, as average diffusion coefficients greatly depend on the type of stationary phase material [17]. In this regard, the first approach was carried out by Tock et al. by precipitating pre-gelled polyethoxysilane from solution in a dynamic [18] and static [17] coating procedure. Their columns showed insufficient retention and loadability because of the low porosity of the resulting silica surface [13]. In a modification of the static

<sup>☆</sup> Presented at the 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Anaheim, CA, USA, 16–21 June 2012.

\* Corresponding author. Tel.: +49 6151 72 2522; fax: +49 6151 72 912522.

E-mail addresses: [stephan.altmaier@merckgroup.com](mailto:stephan.altmaier@merckgroup.com), [Stephan.Altmaier@merck.de](mailto:Stephan.Altmaier@merck.de) (S. Altmaier).



procedure, Crego et al. [19] used the hydrolytic in situ polycondensation of tetraethylorthosilicate (TEOS) for the preparation of thick-films with varying layer thickness in 5–50  $\mu\text{m}$  ID capillaries. Although the chromatographic results were quite promising, the insufficient retention capacity and the need for an adequate sensitive detection system could not be solved. Further progress in the development of sol–gel-derived, silica-based layers was achieved by Colón et al. with the usage of monomer mixtures like TEOS and  $\text{C}_8\text{-TEOS}$  for pressure-driven reversed phase OTLC [20–22] and OT electrochromatography [23,24]. In the last few years, intensified research on porous layer open tubular (PLOT) columns with polystyrene [25–30] and polyacrylate [31–35] based polymeric stationary phases shows the ongoing trend towards miniaturization in LC and renewed interest in open tubular technology. Publications describing the deposition of silica layers in capillaries have become rare, but unmodified silicon dioxide surfaces employed in a chip [36,37] and in single [38] and multipath [39] capillaries have been used to generate enormous efficiencies of up to 1,000,000 theoretical plates in a reasonable time.

In this work, a new approach for depositing a porous thick-film silica layer utilizing sol–gel chemistry is described. It follows the well established technology of monolithic silica formation for LC purposes [40], which has been commercialized by Merck KGaA [41]. In this process, silicon alkoxides like tetramethoxysilane (TMOS) are fully hydrolyzed under acid conditions, the resulting siloxane oligomers forming a bicontinuous network due to polycondensation in the presence of a porogen like polyethyleneoxide (PEO). The interplay between phase separation and sol–gel transition and therefore the skeleton and pore size dimensions usually is controlled by adjusting the TMOS and PEO feed composition [42,43]. Other than that mentioned the morphology and structural properties of the resulting monolithic silica are also strongly affected by the dimension of the reaction vessel template, in which the sol–gel reaction is carried out [44–49]. If the wall to volume ratio in this vessel is very high – which is the case in small ID capillaries – a process called “surface directed spinodal decomposition” [50] occurs, which results in a preferred wetting of the surface. The mechanism and resulting structure of a wall-affected phase separation within a siloxane sol–gel reaction was described in detail by Kanamori et al. [47]. Prolonging the time between phase separation and sol–gel transition by means of reducing both temperature and porogen concentration, a continuous layer is generated instead of the sponge-like monolithic structure obtained in bulk materials. Detobel et al. [51,52] utilized this effect in combination with a template of microdistant pillars arranged on a chip, thus assuring the confined space dimension, and employed this chip as a column for pressure-driven LC. Here, we report on the synthesis of small ID silica OT capillaries utilizing this technology for the preparation of a porous film as the stationary phase. Resulting first generation columns were tested in normal phase isocratic mode and the morphology of the films was investigated using scanning electron microscopy (SEM).

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Tetramethoxysilane, urea, poly(ethylene oxide) (MW 10,000) and ethanol were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Deionized water was further purified with a MilliQ Academic 0.22  $\mu\text{m}$  Water System (MerckMillipore, Darmstadt, Germany). For the production of 0.01 M acetic acid a Titrisol pack (Merck KGaA) was diluted with water to obtain 5 L of solution. HPLC eluents (heptane, 1,4-dioxane) and samples (toluene, nitrobenzene, anisole, 2-nitroanisole, 3-nitroanisole, 4-nitroanisole) were

purchased from Merck KGaA and used as received without any further purification.

### 2.2. Instrumentation

#### 2.2.1. Nano-LC

Column efficiency and retention capacity were evaluated using a Dionex Ultimate 3000 nano LC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with a 3 nL detector cell for sensitive very small volume detection. To avoid band broadening related to extra column volume in isocratic mode, an additional flow split between injection device and the OT capillary inlet was assembled (JR-BPR2, Vici, Switzerland) and pre-column flow rate was set to 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The capillary outlet was directly coupled to the detector inlet with minimal dead volume using a Teflon sleeve (250  $\mu\text{m}$  ID, Thermo Fisher Scientific) and no make-up liquid was used. Normal phase chromatography was conducted with heptane/dioxane 95/5 (v/v) as eluent in isocratic mode at room temperature. Acquisition and post-run analysis was carried out with Chromeleon software (version 6.8, Thermo Fisher Scientific).

#### 2.2.2. Scanning electron microscopy

Micrographs were obtained using a ZEISS Leo Supra 35 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) instrument, equipped with a field emission cathode, operated at 5 kV acceleration voltage. Capillaries and bulk monolithic samples were platinum-sputtered with a thickness of 5 nm prior to image acquisition. Layer thickness was determined by measuring the SEM images in the acquisition software (Leo-32, version 4.0) with an estimated deviation of approximately 5%.

#### 2.2.3. Nitrogen sorption

All nitrogen sorption experiments were conducted at 77 K utilizing an ASAP 2420 and supplied software version 1.03a from Micromeritics (Norcross, GA, USA). Before analysis approximately 0.1 g of each sample is being degassed under vacuum to remove adsorbed matter. For this purpose the material is stepwise being heated to 250 °C over a period of altogether approximately 3 h and kept at constant temperature for another 4 h. Mesopore size distributions were calculated from the adsorption branch of the isotherm utilizing the method of Barrett, Joyner and Halenda (BJH), specific surface areas were determined by applying the Brunauer–Emmet–Teller (BET) method utilizing data points in the  $p/p_0$  range of 0.1–0.4.

### 2.3. OT column preparation

Fused silica capillaries of 15–100  $\mu\text{m}$  ID and 365  $\mu\text{m}$  OD were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), the desired column length was cut with a ceramic capillary cutter (Thermo Fisher Scientific) and connected to a PHD 2000 syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) using polyetheretherketone tubings and a Whatman microfiltration membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). For a typical synthesis, 4.3 g polyethyleneoxide and 8.0 g urea were dissolved in 100 mL 0.01 M acetic acid and cooled down to 5 °C. 50 mL TMOS were added and the solution was stirred at 5 °C for 30 min. After the sol was heated to room temperature in a 25 °C water bath, it was filled into the capillary at constant flow rate and volume, both depending on ID and length of the fused silica used for preparation. The capillary ends were sealed using a rubber and then stored at 25 °C for 20 h. Formation of mesoporosity was performed using a temperature treatment at elevated temperature. Finally, in situ generated ammonia was exchanged using an LC pump at 150 bar for at least 2 h and water and ethanol as solvents.

**Table 1**

Selected open tubular syntheses with various capillary inner diameters (ID). Nitrogen ( $N_2$ ) pressure of 5 bar was applied to sample OT3\_50\_N2 90 min after filling the capillary with reaction mixture.

Sample	ID ( $\mu\text{m}$ )	Length (m)	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	AcOH (mL)	Urea (g)	PEO (g)	TMOS (mL)	$N_2$ pressure
OT1_100	100	10	25	100	10	4.0	50	–
OT2_50	50	3	25	100	8	4.3	50	–
OT3_50_N2	50	3	25	100	8	4.3	50	After 90 min
OT4_15	15	3	25	100	8	4.3	50	–

### 3. Results and discussion

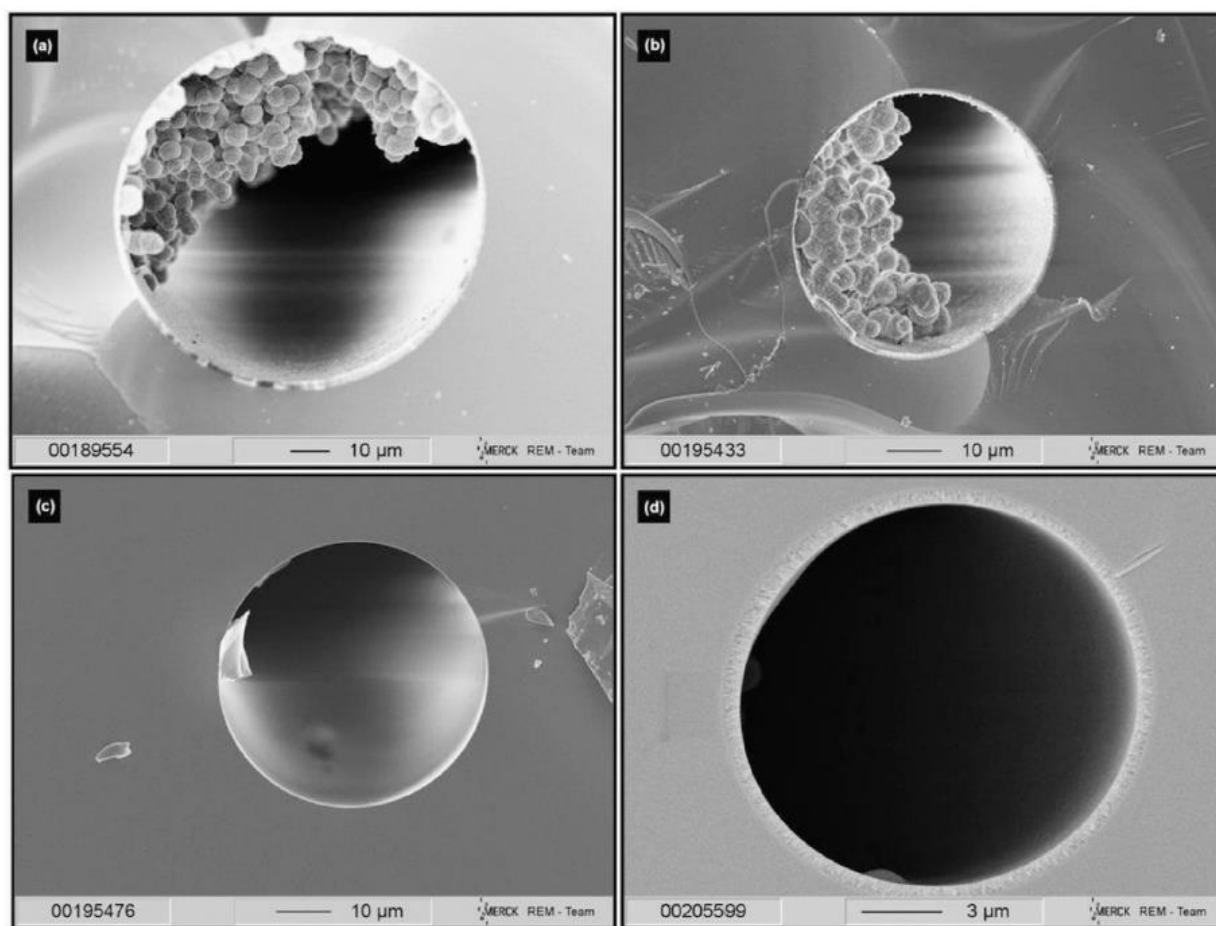
#### 3.1. Filling procedure and stationary phase synthesis

Reproducible filling of very narrow capillaries with a length of several meters is challenging, as the viscosity of the feed sol gradually emerges when polysiloxane oligomers are generated in situ. Therefore, the syringe pump and connection tubings have to withstand high pressure and leakage must be avoided. The success rate of this important step strongly depends on the inner diameter of the capillary employed, as a reduction of its radius increases backpressure quadratically. In addition to that also the capillary length influences backpressure in a linear manner. In order to ensure reproducibility, the filling process has to be performed without any

interruptions, in a limited time and clearly before sol–gel transition (i.e. solidification) of the reaction composition takes place.

All fused silica capillaries were used as received and without pretreatment prior to synthesis. In general, the covalent attachment of silica depends on available free silanol moieties on the inner surface of fused silica capillaries. As was investigated by us earlier (data not published), there was no need to increase the silanol density in this work.

A selection of experimental data is shown in Table 1. Capillary inner diameter was stepwise scaled down from 100  $\mu\text{m}$  to 15  $\mu\text{m}$  and the resulting sample morphology was investigated by SEM imaging (Fig. 1). A stream of nitrogen (5 bar) was applied to one capillary piece for removal of liquid before solidification of the gelling solution (OT3\_50\_N2). Samples with an inner diameter of less than



**Fig. 1.** Cross-section SEM image of capillary samples listed in Table 1. (a) OT1, 100  $\mu\text{m}$  ID, (b) OT2, 50  $\mu\text{m}$  ID, (c) OT3, 50  $\mu\text{m}$  ID after nitrogen treatment and (d) OT4, 15  $\mu\text{m}$  ID. Scale bars correspond to 10  $\mu\text{m}$ , with the exception of (d), which is 3  $\mu\text{m}$  for the small ID sample.



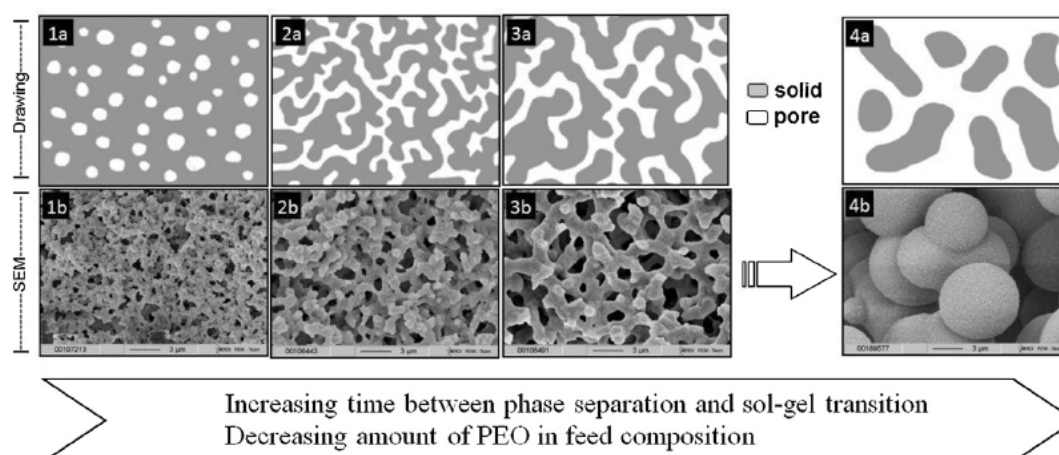


Fig. 2. Schematic drawing of phase separation versus sol-gel transition (top) and corresponding SEM images (middle). The arrow (bottom) shows the evolution of a reacting solution with time (transition from isolated pores via bicontinuous networks to particle aggregates). The morphology of a resulting gel depends on the correlation of phase separation and sol-gel transition times. Scale bar (SEMs) corresponds to 3  $\mu\text{m}$ .

15  $\mu\text{m}$  became clogged in this first set of experiments (data not shown).

### 3.2. Structural investigation

#### 3.2.1. Bulk material

The macroporosity of bulk silica monoliths results from the interplay of temperature and the ratio of solvent, porogen and silane concentration. Competing processes of phase separation and sol-gel transition occur simultaneously, offering a tunable macropore (and skeleton) diameter for the bulk material obtained (Fig. 2). Within a considerable range, the sol-gel transition “freezes” the phase separation at a transient stage, which results in the bicontinuous structure of a silica-rich skeleton phase (marked as “solid”) and a silica-poor fluid phase (marked as “pore”) (Fig. 2(2a/b) and (3a/b)). If the onset of phase separation occurs very early compared to the sol-gel transition, the system forms aggregated, particle-like structures (Fig. 2(4a/4b)). This situation corresponds to a “quasi” high skeleton and macropore diameter. In this work the deposition of these particle aggregates in capillaries was achieved by two measures: First, a lowering of the reaction temperature, which decreases the solubility of constituents (and therefore favors phase separation tendency) and delays the solidification of the sol (because of a decelerated polycondensation reaction). Second, a reduction of porogen concentration, which generally leads to an earlier phase separation [53] and hence bigger macropore sizes.

Vice versa, both ways are usually employed for downsizing monolithic skeleton diameters hence improving column efficiency due to a reduced diffusion length for solutes in the mobile phase. However, for the construction of a homogeneous layer inside a confined space like small ID capillaries, one has to use a sol-gel reaction featuring a sol-gel transition retarded in comparison to the onset of phase separation (see Tables 2 and 3).

SEM images of a bulk monolith, derived from the same sol as used for the capillary synthesis but prepared in a bulky vessel, show the expected particle aggregation (Fig. 3). In the close-up view (Fig. 3(c)), the mesoporosity of the silica surface is observable. Data from nitrogen sorption reveals an average pore width of 9 nm and a surface area of 300  $\text{m}^2/\text{g}$ . As these measurements were carried out using silica bulk monolithic samples, they cannot be used for detailed investigation of the silica surface prepared in a capillary. The latter simply does not offer enough material for nitrogen sorption analysis.

#### 3.2.2. Capillaries

In spacious capillaries (50 and 100  $\mu\text{m}$  ID), the morphology of the resulting silica resembles the one obtained in bulky reaction vessels, so aggregates of particles can be found for samples shown in Fig. 1(a) and (b). These particles settled at the bottom of the capillary due to gravitation effects. However, in addition to this undesirable finding, a silica layer was deposited on the capillary wall, raising the question, if unwanted bulk material could selectively be forced

Table 2

Chromatographic data of separation shown in Fig. 5 (RT, retention time; AS, asymmetry (USP); TP, theoretical plates (USP);  $K'$ , retention factor).

#	Name	RT (min)	AS	TP	TP (m)	$K'$
1	Toluene ( $t_0$ )	7.81	1.73	117.909	39.303	–
2	Nitrobenzene	8.74	1.64	85.047	28.349	0.12
3	2-Nitroanisole	11.93	1.51	50.075	16.692	0.53

Table 3

Chromatographic data of separated anisole isomers shown in Fig. 6 (RT, retention time; AS, asymmetry (USP); TP, theoretical plates (USP);  $K'$ , retention factor).

#	Name	RT (min)	AS	TP	TP (m)	$K'$
1	Toluene ( $t_0$ )	28.13	–	160.570	26.762	–
2	Anisole	29.01	2.60	175.471	29.245	0.03
3	3-Nitroanisole	33.45	2.13	164.393	27.399	0.19
3	4-Nitroanisole	37.73	2.00	113.034	18.839	0.34
3	2-Nitroanisole	44.88	1.85	167.121	27.854	0.60

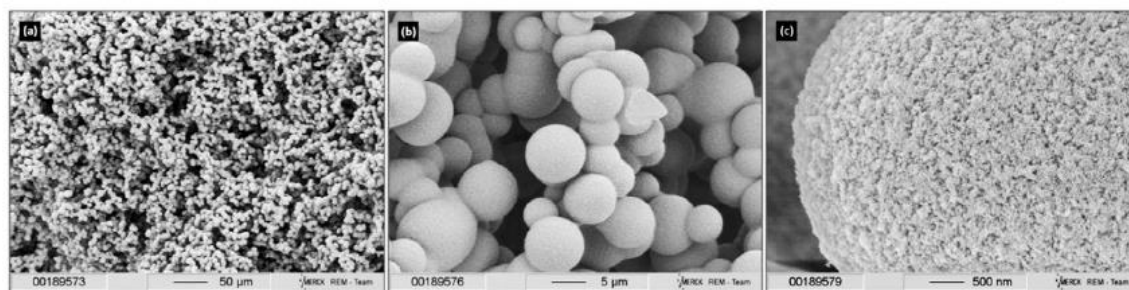


Fig. 3. SEM images of bulk material derived from the feed composition used for sample OT4.15. (a) Macroporosity (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ), (b) particle aggregation (scale bar 5  $\mu\text{m}$ ), (c) mesoporosity (scale bar 0.5  $\mu\text{m}$ ).

out by a nitrogen stream. Unfortunately, as can be seen in Fig. 1(c), capillaries appear to be empty after such a treatment.

When the capillary ID becomes smaller, a homogeneous layer, covalently attached to the wall, is observed and the influence of gravitation during phase separation vanishes (Fig. 1(d)). In contrast to capillaries with large ID, no macrostructures could be spotted inside the small ID capillaries (see cross-section overview in Fig. 4(b)). This might also be the result of excessive washing with water and ethanol at high pressure during column preparation procedure, a process hydrodynamically removing weakly or unbonded silica particles. The capillary piece shown in the overview picture

(Fig. 4(a)) was prepared using a ceramic cutter, its resulting breaking edge quality strongly depends on the way of usage.

Visual appearance of the stationary phase mesoporosity in closeup view (Fig. 4(c) and (d)) is partly affected by the additional layer of sputtered platinum originating from the SEM sample preparation procedure. The silica layer thickness slightly decreases along column flowpath, from approximately 550 nm at column inlet (Fig. 4(c)) to 490 nm at column outlet (Fig. 4(d)). This was expected due to the filling procedure, which provides a longer layer deposition time for the inlet section of the capillary. As filling procedure was stopped after the first droplet was spotted at column

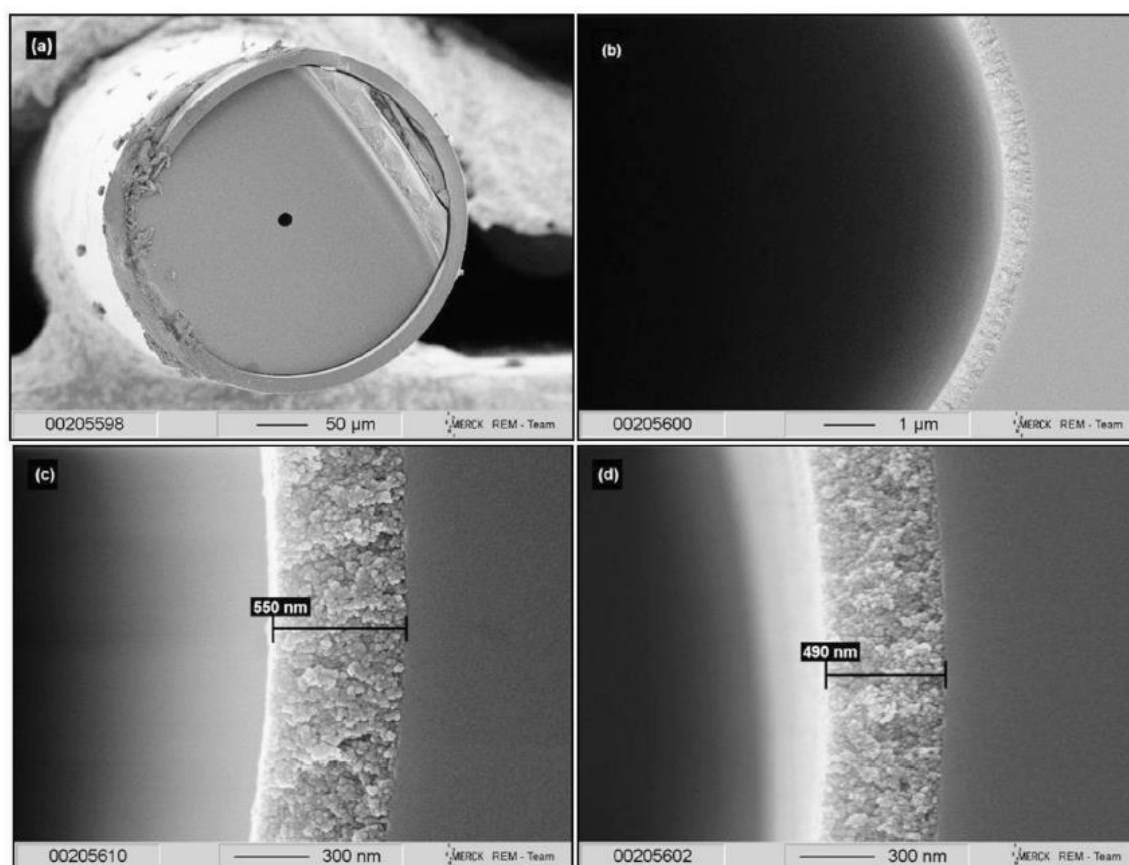


Fig. 4. SEM images of capillary sample OT4.15. (a) Cross-section overview, (b) flow-through pore with no macrostructures adhered to the layer, (c) close-up view of silica layer at capillary inlet, (d) close-up view of silica layer at capillary outlet.



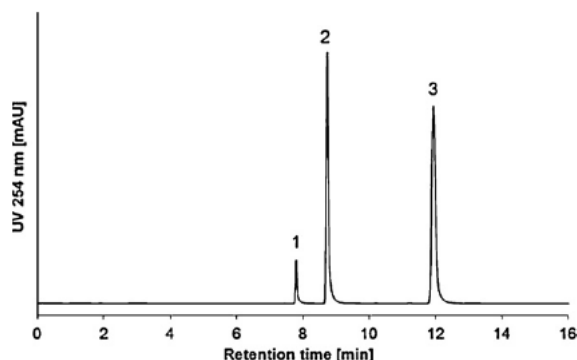


Fig. 5. Chromatogram of a test mixture separation with column sample OT4.15. Chromatographic conditions are as follows: column length: 3 m; temp.: ambient; detector cell: 3 nL, operated at 254 nm; column pressure drop: 36 bar; eluent: n-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v) in isocratic mode; inject volume: 1  $\mu$ L full loop mode (before split). Linear flow rate was calculated to be 6.4 mm/s.

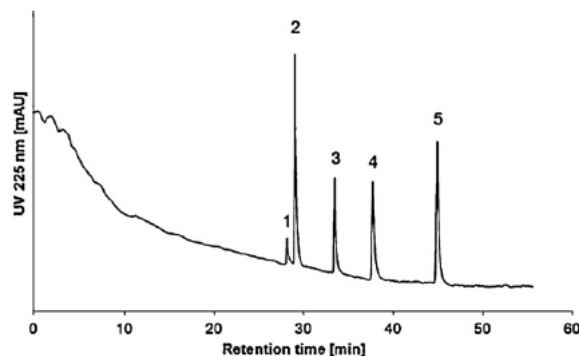


Fig. 6. Separation of anisole isomers with two column samples like OT4.15. Chromatographic conditions are as follows: column length: 6 m ( $2 \times 3$  m with nano-tight connector); temp.: ambient; detector cell: 3 nL, operated at 225 nm; column pressure drop: 40 bar; eluent: n-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v) in isocratic mode; inject volume: 1  $\mu$ L full loop mode (before split). Linear flow rate was calculated to be 3.6 mm/s.

outlet, this result possibly enables an intentional and controllable way of layer thickness variation and is under investigation. Layer thickness and accordingly surface area has to be high enough for sufficient mass loadability, but should also be small enough for maximum kinetic column performance [15]. These prerequisites imply an optimal layer thickness for a given capillary inner diameter.

### 3.3. Normal phase chromatography

Various normal phase separations have been carried out in order to benchmark the chromatographic performance of these first generation capillaries. Compared to particle packed or monolithic columns the significantly reduced backpressure per meter of course originates from the large through-pore size and is a unique open tubular feature all tested columns had in common.

All chromatographic data stated below was obtained with sample OT4.15, which offered the highest performance of all capillaries tested. Samples OT1 to OT3 showed unsufficient results, with OT3.50.N2 lacking any retention capacity (data not shown).

At a length of 3 m the total inner volume of an empty 15  $\mu$ m ID capillary is ca. 0.53  $\mu$ L, decreasing to ca. 0.46  $\mu$ L after coating. This limits the actual column flow to well below 100 nL/min due to the constraint of a slow linear velocity necessary for sufficient column efficiency.

For this reason, a splitting device between injection port and column inlet was inserted to minimize extra column band broadening contributions related to the sample injection. With this setup optimized for isocratic conditions, real injection volumes were far below 1 nL, a volume hardly manageable with up-to-date autosampler nano-LC devices. Additionally, full loop injection mode (1  $\mu$ L loop volume) could be used, which provides the highest reproducibility.

Fig. 5 shows the normal phase separation of a test mixture containing toluene as dead marker and nitrobenzene as well as 2-nitroanisole as retained solutes. 50,000 theoretical plates were generated in 12 min with a column length of 3 m. The most retained compound, 2-nitroanisole, was further separated from its isomers (Fig. 6) on a column 6 m long. This setup was achieved by coupling of two capillaries with a length of 3 m each utilizing a nano-tight connector. Total column performance significantly improved, yielding 167,000 theoretical plates for the last eluting compound. Although the capacity factors ( $k'$ ) are consistently  $<1$ , all compounds were baseline separated even in isocratic mode.

All separations shown in this work display a more or less significant tailing for all compounds. As the retention mechanism is primarily based on adsorption and desorption of solutes to and from the stationary phase, it is unclear whether an underlying, secondary retention mechanism could be involved. The major contribution to peak tailing is most likely related to the equipment itself, especially to the connection of the capillary column. Avoidance of unswept, extra column dead volume is crucial for this column type because of its very low flow rates. As described above, the special split flow injection circumvents the (otherwise) unavoidable formation of a dead volume at the capillary inlet. An optimization at the capillary outlet can be performed by a precise cutting edge and a very close-by connection to the UV detector cell capillary. This keeps post-column dead volume low and minimizes the negative effects in column performance and peak shape. In general, neglecting this issue might lead to a reduced performance measurement, which is not necessarily attributed to the column itself.

If coupling to an external detector is desired and no on-column-detection is carried out, this situation can only be improved by an elevated column flow. Raising the linear flow, however, directly leads to a decrease in column efficiency due to mass transfer limitation. Further downsizing the inner diameter of a capillary will improve plate count, as the optimum linear flow rate will increase with a decrease in column dimension. For the analysis shown above, both separations were carried out with a flow rate at least two times (3.6 mm/s, 6 m long column, Fig. 6) and up to four times (6.4 mm/s, 3 m long column, Fig. 5) higher than the optimal flow rate, which in our case is around 1–2 mm/s for 15  $\mu$ m ID capillaries (data not shown). In general, a compromise between analysis time and column efficiency has to be made, the latter implying a limitation related to extra-column band broadening for very slow separations.

### 4. Conclusion

Silica sol-gel technology in confined spaces was successfully applied to the preparation of small ID open tubular capillaries. In a set of experiments, synthesis procedure was investigated and resulting layer morphology was determined using SEM imaging. Nano-LC columns with a layer thickness allowing for sufficient mass loadability were prepared and utilized in normal phase liquid chromatography mode, and enabled high efficiency separations. Two application examples are shown, one optimized for a good efficiency within a relatively short separation time and one designed

for high overall performance. Both separations demonstrate the applicability of this type of open tubular column utilizing standard HPLC hardware. Although these results are quite promising, further investigation has to be carried out aiming at reduced column inner diameter variants with appropriate layer thicknesses. In this regard, the trade-off between performance gain and preparation feasibility has to be found out. Expanding the chromatographic application range by means of generating hydrophobic properties of the layer will allow for a more detailed chromatographic characterization, including high sensitivity mass spectrometry detection.

### Acknowledgments

The authors are grateful to MerckMillipore for intellectual, financial and material support for this work. We thank Stefan Köhl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for the acquisition of SEM images.

### References

- [1] M.J.E. Golay, *Nature* 180 (1957) 435.
- [2] T. Tsuda, K. Hibi, T. Nakanishi, T. Takeuchi, D. Ishii, *J. Chromatogr.* 158 (1978) 227.
- [3] D. Ishii, T. Takeuchi, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 462.
- [4] J. Jorgenson, E.J. Guthrie, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 335.
- [5] P.R. Dluznieski, J.W. Jorgenson, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11 (1988) 332.
- [6] R. Tijssen, J.P.A. Bleumer, A.L.C. Smit, M.E. van Krevel, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 137.
- [7] F. Yang, *J. HRC CC 3* (1980) 589.
- [8] F. Yang, *J. Chromatogr. Sci.* 20 (1982) 241.
- [9] G. Guiochon, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1318.
- [10] J.H. Knox, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 453.
- [11] K. Hibi, D. Ishii, I. Fujishima, T. Takeuchi, T. Nakanishi, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* (1978) 21.
- [12] D. Ishii, T. Tsuda, K. Hibi, T. Takeuchi, T. Nakanishi, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 2 (1979) 371.
- [13] R. Swart, J.C. Kraak, H. Poppe, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 332.
- [14] J.H. Knox, M.T. Gilbert, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 405.
- [15] T.J. Causon, R.A. Shellie, E.F. Hilder, G. Desmet, S. Eeltink, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8388.
- [16] R.P.W. Scott, *J. Chromatogr.* 517 (1990) 297.
- [17] P.P.H. Tock, C. Boshoven, H. Poppe, J.C. Kraak, *J. Chromatogr.* 477 (1989) 95.
- [18] P.P.H. Tock, G. Stegeman, R. Peerboom, H. Poppe, J.C. Kraak, K.K. Unger, *Chromatographia* 24 (1987) 617.
- [19] A.L. Crego, J.C. Díez-Masa, M.V. Dabrio, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1615.
- [20] Y. Guo, L.A. Colón, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2511.
- [21] Y. Guo, L.A. Colón, *J. Microcolumn Sep.* 7 (1995) 485.
- [22] Y. Guo, L.A. Colón, *Chromatographia* 43 (1996) 477.
- [23] S.A. Rodríguez, L.A. Colón, *Anal. Chim. Acta* 397 (1999) 207.
- [24] S.A. Rodríguez, L.A. Colón, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 472.
- [25] M. Røgeberg, S.R. Wilson, T. Greibrokk, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2782.
- [26] D. Thakur, T. Rejtar, D. Wang, J. Bones, S. Cha, B. Clodfelder-Miller, E. Richardson, S. Binns, S. Dahiya, D. Sgroi, B.L. Karger, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8168.
- [27] G. Yue, Q. Luo, J. Zhang, S.-L. Wu, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 79 (2007) 938.
- [28] Q. Luo, G. Yue, G.A. Valaskovic, Y. Gu, S.-L. Wu, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6174.
- [29] Q. Luo, Y. Gu, S.-L. Wu, T. Rejtar, B.L. Karger, *Electrophoresis* 29 (2008) 1604.
- [30] Q. Luo, T. Rejtar, S.-L. Wu, B.L. Karger, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1223.
- [31] D.A. Collins, E.P. Nesterenko, D. Brabazon, B. Paull, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3465.
- [32] E. Nesterenko, O. Yavorska, M. Macka, A. Yavorskiy, B. Paull, *Anal. Methods* 3 (2011) 537.
- [33] S. Abele, P. Smejkal, O. Yavorska, F. Foret, M. Macka, *Analyst* 135 (2010) 477.
- [34] X. Zhang, J. Yang, S. Liu, X. Lin, Z. Xie, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3383.
- [35] Y. Shen, L. Qi, J. Qin, H. Zhang, J. Qiao, Y. Chen, L. Mao, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3538.
- [36] W. De Malsche, S. De Bruyne, J. Op De Beek, P. Sandra, H. Gardeniers, G. Desmet, F. Lynen, *J. Chromatogr. A* 1230 (2012) 41.
- [37] W. De Malsche, J. Op De Beek, S. De Bruyne, H. Gardeniers, G. Desmet, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1214.
- [38] X. Wang, S. Wang, V. Veerappan, C.K. Byun, H. Nguyen, B. Gendhar, R.D. Allen, S. Liu, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5583.
- [39] A.B. Daley, R.D. Wright, R.D. Oleschuk, *Anal. Chim. Acta* 690 (2011) 253.
- [40] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3498.
- [41] K. Cabrera, G. Wieland, D. Lubda, K. Nakanishi, N.H. Soga, H. Minakuchi, K.K. Unger, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 50.
- [42] S. Altmair, K. Cabrera, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2551.
- [43] T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 89.
- [44] K. Kanamori, H. Yonezawa, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 874.
- [45] K. Kanamori, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *Langmuir* 19 (2003) 5581.
- [46] K. Kanamori, N. Ishizuka, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 26 (2003) 157.
- [47] K. Kanamori, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 241 (2004) 215.
- [48] K. Kanamori, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 35 (2005) 183.
- [49] Y. Suzumura, K. Kanamori, K. Nakanishi, K. Hirao, J. Yamamichi, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 94.
- [50] H. Tanaka, *J. Phys.: Condens. Matter* 13 (2001) 4637.
- [51] F. Detobel, H. Eghbali, S. De Bruyne, H. Terryn, H. Gardeniers, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7360.
- [52] F. Detobel, S. De Bruyne, J. Vangelooen, W. De Malsche, T. Aerts, H. Terryn, H. Gardeniers, S. Eeltink, G. Desmet, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7208.
- [53] N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35.



---

## 2.2. Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography

### Authors:

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b</sup>

### Institutions:

<sup>a</sup>Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>b</sup>Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

### Bibliographic data:

Journal of Chromatography A, 2013, 1283, 110-115.

DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.107

Received: December 14, 2012

Received in revised form: January 25, 2013

Accepted: January 28, 2013

Published online: February 04, 2013

### Keywords:

Open tubular capillary

Silica sol-gel synthesis

Confined space

Permeability

Reversed phase liquid chromatography

### Short summary:

Reversed phase 15  $\mu\text{m}$  ID variant was investigated in detail regarding permeability and chromatographic efficiency. Additionally, two reversed phase application examples are shown.

### Link:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313002422>

Reproduced by permission of Elsevier



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany<sup>b</sup> Merck KGaA, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 December 2012

Received in revised form 25 January 2013

Accepted 28 January 2013

Available online 4 February 2013

#### Keywords:

Open tubular capillary

Silica sol-gel synthesis

Confined space

Permeability

Reversed phase liquid chromatography

### ABSTRACT

The unquestioned potential of open tubular column design for miniaturized liquid chromatography systems has been assessed recently. Instrument limitation and insufficient mass loadability of the columns, however, have prevented experimental breakthrough in this field, the latter requiring new methods for the deposition of thick films as the stationary phase. In this work, a previously proposed synthesis strategy has been applied for the preparation of a C<sub>8</sub> modified 15  $\mu$ m inner diameter variant of 3 m length, providing a silica porous layer with a thickness of approximately 500 nm. The capillary column has been evaluated in terms of usability, permeability and chromatographic efficiency in reversed phase mode. Data was compared to both a monolithic and a particulate, commercially available C<sub>18</sub> capillary column. High theoretical plate numbers have been generated in a test mixture separation composed of small molecules and the applicability of this new type of column was demonstrated by two reversed phase applications.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The concept of open tubular (OT) column technology was transferred from gas to liquid chromatography (LC) for the first time by Tsuda et al. in the late 1970s [1]. The characteristic feature of this long and narrow column design comprises a large flow through pore, which results from the remaining void within a film coated or otherwise treated capillary. Although column efficiency gain compared to packed beds was calculated to be theoretically superior [2,3], pressure-driven OT column design has not been established practically until today. 30 years ago, this was mainly due to instrument limitation concerning appropriate detection of nano flow rates [4]. But even today, with suitable nano LC instrumentation being available, development of OT capillary technology is still lacking behind. Particularly in the academic field there is continuous interest in this technology, as the OT column design was considered to be one of the drivers for LC miniaturization in a recently published review by Desmet and Eeltink [5]. As a result of the high permeability, values for the separation impedance  $E_{min}$  are expected to be 100 times lower compared to packed bed columns. Even considering a thick film stationary phase, a significant reduction of analysis time for separations requiring high theoretical plate numbers can be achieved with an OT capillary of 5  $\mu$ m ID [6].

The second driver for the implementation of miniaturized LC systems like OT capillaries is detection sensitivity. In case of limited sample volume available, intensity at the detector is higher using very small volume capillaries compared to standard bore columns. A corresponding major disadvantage in this regard is the necessity to use nanoscale detector cells which again challenge the sensitivity gain due to a reduced signal-to-noise ratio [5]. When applying nano flow electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) detection, volumetric flow rates originating from OT columns are most suitable for high detection sensitivity [7].

One major obstacle in the fabrication of OT capillaries has been the very low mass loadability due to an insufficient layer thickness or low porosity of the stationary phase [8]. In this regard, chemical modifications of the capillary inner wall, hence creating monolayers, give insufficient results. Acceptable retention can only be achieved by depositing porous thick films, therefore allowing the injection of larger sample volumes [9]. Compared to OT gas chromatography, thicker films can be used in LC as diffusion coefficients of solutes in liquid phase greatly differ from those in gas phase. Accordingly, phase ratios (layer thickness divided by the resulting flow through pore) can be 0.5–1 without a significant loss of efficiency caused by the stationary phase mass transfer limitation. Corresponding column IDs necessarily would be very narrow (<5  $\mu$ m), which causes serious technological challenges in manufacturing columns featuring lengths up to several meters. Therefore, in practice, a compromise between theoretical OT column efficiency and experimental feasibility is always made.

\* Corresponding author. Tel.: +49 6151 72 2522; fax: +49 6151 72 912522.

E-mail addresses: [simon.forster@arcor.de](mailto:simon.forster@arcor.de) (S. Forster), [kolmar@biochemie-tud.de](mailto:kolmar@biochemie-tud.de) (H. Kolmar), [stephan.altmaier@merckgroup.com](mailto:stephan.altmaier@merckgroup.com) (S. Altmaier).

While porous layer open tubular (PLOT) stationary phases comprising an organic polymeric layer were used in LC/MS proteomics throughout the last five years by the Karger group [10–12], experimental progress on silica film deposition for pressure-driven OT capillary chromatography has stagnated. Referring to this, first research was carried out by the Poppe group utilizing a pre-gelled polyethoxysilane solution in a static [13] and dynamic [14] coating procedure. Similarly to the work by Crego et al. [15], capillaries were lacking sufficient retention factors, although the latter already offered high efficiencies. In recent years, the Desmet group applied silica sol-gel chemistry for the formation of a porous layer on  $\mu\text{m}$ -equidistant pillars arranged on a chip [16–18]. This technology is based on monolith formation in any kind of confined space providing a very high wall-to-volume ratio [19]. The coral-like monolithic structure, which would be expected from a bulk synthesis, is suppressed by a “surface directed spinodal decomposition” mechanism [20]. This results in a preferred wetting of the surface and the subsequent formation of a homogeneous silica layer. The utilization of this micro-scale phenomenon for the fabrication of thick film OTLC capillaries has been published previously [21].

In this work, we describe the application of a 15  $\mu\text{m}$  ID capillary, synthesized according to the method mentioned above in reversed phase liquid chromatography. Usability, permeability and chromatographic efficiency of this new generation of OT capillary is assessed and compared to commercially available  $\text{C}_{18}$  capillary columns using standard LC instrumentation.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Tetramethoxysilane, urea, poly(ethylene oxide) (MW 10,000), *N,N*-dimethylamino-dimethyl-octylsilane and ethanol were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Deionized water was further purified with a MilliQ Academic 0.22  $\mu\text{m}$  Water System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). For the production of 0.01 M acetic acid a Titrisol pack (Merck KGaA) was diluted with water to obtain 5 L of solution. HPLC solvent acetonitrile and samples (uracil, alkylbenzenes and 32 pesticides) were purchased from Merck KGaA and used as received without any further purification.

### 2.2. Preparation of the capillary column

The manufacturing process has been described elsewhere recently [21]. Briefly, a fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with an ID of 15  $\mu\text{m}$  was cut to a length of 3 m and used as received. A mixture of 4.3 g poly(ethylene oxide) and 8.0 g urea was dissolved in 100 mL 0.01 M acetic acid and cooled to 5 °C in a waterbath. 50 mL tetramethoxysilane (TMOS) were added and the solution was stirred at 5 °C for 30 min. The capillary was filled with the sol by means of an LC-pump operated at 400 bar in constant-pressure mode at room temperature. Subsequently, the ends were sealed with a rubber and then stored at 25 °C for 20 h. Fine-tuning of mesoporosity was performed using a hydrothermal treatment at elevated temperature. The column was flushed with water (1 h) to remove in situ generated ammonia and then with toluene for at least 3 h. A solution of 20% *N,N*-dimethylamino-dimethyl-octylsilane (Merck KGaA) in toluene was used for reversed phase modification ( $\text{C}_8$ ) of the column at room temperature for 24 h. Finally, the capillary was flushed with toluene again and with acetonitrile for reversed phase equilibration.

### 2.3. LC instrumentation

Isocratic and gradient mode applications were performed using a Dionex Ultimate 3000 nano LC system (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with a 3 nL UV detector cell. In order to avoid band broadening caused by pre-column dead volume, a flow split between the OT capillary and the injection port was assembled (JR-BPR2, Vici, Switzerland). Pre-column flow rate was varied from 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  to 2.5 mL/min, depending on the column pressure applied. A high flow rate was used for high pressure isocratic separations. The capillary end was directly connected to the UV cell capillary using a teflon sleeve (250  $\mu\text{m}$  ID, Thermo Fisher Scientific). Reversed phase chromatography was conducted with acetonitrile/water as eluents in isocratic and gradient mode. Acquisition and post-run analysis was carried out with Chromeleon software (version 6.8, Thermo Fisher Scientific).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Connection of OT capillaries to LC instrumentation

Reduction of extra column volume is crucial for the investigation of the separation efficiency of narrow micro-bore columns as it instantly will result in undesired band broadening. The inner volume of the 3 m OT capillary utilized in this work with an ID of 15  $\mu\text{m}$  is only 460 nL, assuming a homogeneous silica layer of 500 nm thickness. Post-column dead volume originating from the UV cell cannot be eliminated completely, but its fused silica inlet capillary should be kept as short as possible. In this work, the capillary running through the detector flow cell (10 cm, 20  $\mu\text{m}$  ID) contributes to post-column dead volume with approximately 30 nL. In contrast to commercially available fused silica capillaries comprising a packed or monolithic bed and a length of usually 15 cm, the typical length of OT columns with several meters is advantageous in terms of connecting it to any instrument without secondary fused silica tubings. The connection of the column outlet to the nano-cell UV detector inlet capillary also can have a strong impact on overall efficiency. Lowest dead volumes and therefore best results are obtained by using a simple 250  $\mu\text{m}$  ID teflon sleeve clamping both ends directly to each other. Nano-tight unions will always give lower plate counts in this setup. Pre-column dead time (as well as instrument dwell time) can be minimized via an elevated pre-column flow rate compared to the mobile phase flow rate inside the OT capillary. The interplay between pre-column flow rate and the regulation of column backpressure (by manual split adjustment) also determines the actual injection volume. Only a fraction of the analyte solution in the 1  $\mu\text{L}$  loop used in this work passes the capillary column inlet. For isocratic separations at high pressure – resulting in an elution time of the unretained solute below 1 min – the pre-column flow rate should be set as high as possible to give the best efficiency (2.5 mL/min in this work). This is of course due to the sample concentration prior to the capillary inlet, which accordingly is least diluted within the mobile phase. For medium pressure separations (below 100 bar) and particularly for gradient separations, there was no need for this wasteful mobile phase consumption and the pre-column flow rate was set to 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  without a significant performance drop. The modification of the standard LC instrument described above was optimized toward very low flow rates. The solvent issue certainly can be improved by the use of specifically designed nano-LC equipment with split injection.

### 3.2. Column permeability

One of the characteristic features that comes with OT column design is a very low backpressure (compared to packed and monolith beds). This enables the application of very long capillaries by still using 400 bar standard instruments. Column backpressure was recorded within a range of 2–264 bar using the OT capillary



**Table 1**

Permeability comparison of three different capillary types used in this work. Mobile phase was acetonitrile/water 60/40 (v/v) at room temperature.

Column type	Length [m]	ID [ $\mu\text{m}$ ]	$u$ [mm/s]	$p$ [bar]	$p/u$	$(p/u)/m$	$k_0$ [ $10^{-14} \text{ m}^2$ ]
Particle packed	0.15	75	0.66	46	69.7	464.6	1.55
	0.15	75	1.32	90	68.2	454.5	1.58
	0.15	75	4.32	295	68.3	455.2	1.58
Monolithic	0.15	100	0.47	14	29.8	198.6	3.63
	0.15	100	1.96	58	29.6	197.3	3.65
	0.15	100	7.58	224	29.6	197.0	3.66
Open tubular	3.0	15	0.60	2	3.3	1.1	648.00
	3.0	15	23.40	80	3.4	1.1	631.80
	3.0	15	81.40	264	3.2	1.1	666.00

ID: capillary inner diameter;  $u$ : linear flow rate [mm/s];  $p$ : column backpressure, without instrument contribution;  $k_0$ : specific permeability (see text).

and compared to silica monolithic and particle packed capillaries (Table 1). The latter two are commercially available and were used as reference materials in this work. The monolith offered a flow through pore of approximately 1.1  $\mu\text{m}$ , the particle size of the packed column was 3.5  $\mu\text{m}$ . Both columns had a length of 15 cm, the ID was 75  $\mu\text{m}$  for the particulate column and 100  $\mu\text{m}$  for the monolith, respectively. All three column types were analyzed utilizing the same experiment using a mobile phase composition of acetonitrile/water 60/40 (v/v) at room temperature. Linear flow rates were calculated using the elution time of the unretained solute uracil. Manufacturer specifications concerning maximum backpressure to be applied were 200 bar (monolith) and 300 bar (particle packed). Values obtained for permeability  $p/u$  demonstrate the very low backpressure of the OT column, especially when reduced to a length equivalent which was expressed by  $(p/u)/m$ . According to the Darcy equation, the specific permeability  $k_0$  was calculated by

$$k_0 = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p} \quad (1)$$

where  $u$  is the linear flow rate,  $\eta$  is the dynamic viscosity of the mobile phase,  $L$  is the column length and  $\Delta p$  is the column pressure drop. Different column IDs of particulate or monolithic capillaries do not affect backpressure at constant linear flow rate. In contrast, for OT columns backpressure basically depends on the ID of the capillary. The 15  $\mu\text{m}$  ID variant used in this work exhibited a higher permeability with an average gain factor of 178, compared to the monolith, and 413, compared to the particle packed capillary. All three column types were tested at various linear flow rates and displayed almost identical  $k_0$  values each time. The OT column can be operated within a wide range of linear flow rates, an effect of its relatively large “flow through pore” of 14  $\mu\text{m}$ . The impact of flow rate on column efficiency will be discussed in Section 3.3. Other than linear flow rates, corresponding volumetric flow rates can bear quite practical implications. Compared to the 75/100  $\mu\text{m}$  reference capillaries, only at high pressure the fluid flow is sufficiently high to overcome diffusion limitation in connectors and UV cell. At highest speed ( $u = 81.4 \text{ mm/s}$ ), the calculated volumetric flow rate is approximately 750 nL/min, which can be handled easily. For the lowest speed ( $u = 0.6 \text{ mm/s}$ ), volume velocity is only 5–10 nL/min. Fig. 1 shows the clear differences in  $p/u$ -curves for all three column types tested. Maximum linear flow rate of the packed and monolithic capillary was determined by pressure limitation, while the linear flow rate range of the OT column is shown only in part.

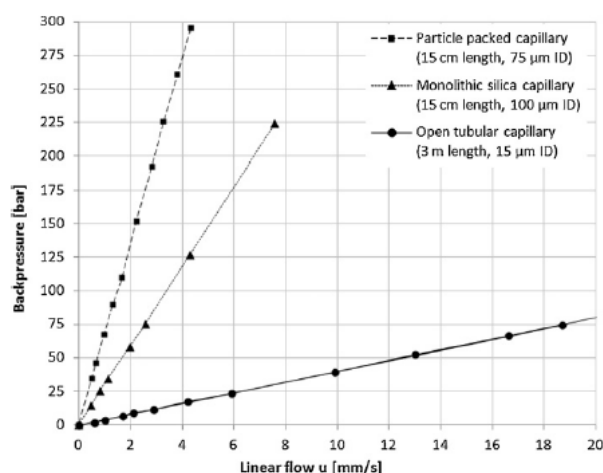
### 3.3. Performance evaluation

The assessment of the chromatographic efficiency of the new reversed phase OT column was done using a simple test mixture of two standard compounds (uracil, propylbenzene). Uracil is not retained on reversed phase materials and has already been used as dead marker for the calculation of the linear flow rate in Section 3.2. Propylbenzene was unequally retained on the columns tested,

with the particle packed capillary offering the highest retention factor. Therefore, mobile phase composition was adjusted in each case to result in a retention factor of  $k$  (propylbenzene) = 0.3. Fig. 2 shows an example of this separation in less than a minute at highest flow rate applying the OT capillary. Complete chromatographic data is individually listed in Table 2 for both compounds. It is noteworthy that all peaks analyzed within the pressure range display an excellent peak shape (asymmetry factor: 1.0–1.1), comprising a slight trend to marginal tailing for low speed separations. This was expected due to inevitable post column dead volume related to the detector inlet and the cell itself. As already discussed in Section 3.1, connection of the properly cut OT capillary outlet is crucial. In contrast to peak shape, column efficiency is significantly stronger influenced by the linear flow rate applied. Lowest plate count is observed at highest speed ( $u = 81.4 \text{ mm/s}$ , retention time (propylbenzene) = 0.76 min) at pressure maximum, while best efficiency (167,000 theoretical plates) was recorded with a retention time of 64 min ( $u = 1.0 \text{ mm/s}$ ). This data demonstrates the inescapable trade-off between analysis time and efficiency. Due to the wide pressure range OT column operation, the impact of linear flow rate on its efficiency is very pronounced compared to the reference columns.

#### 3.3.1. Van Deemter-curve

Column efficiency is usually expressed by the van Deemter-plot (Fig. 3). Values for HETP (height equivalent to a theoretical



**Fig. 1.** Pressure/flow diagram showing high permeability of 3 m OT column type in comparison to other stationary phase formats. Squares: commercially available capillary packed with 3.5  $\mu\text{m}$  silica particles; triangles: commercially available capillary with a silica monolith (through pore size approximately 1.1  $\mu\text{m}$ ); circles: 15  $\mu\text{m}$  OT capillary, layer thickness approximately 500 nm (pressure maximum not shown). Backpressure values without instrument contribution.

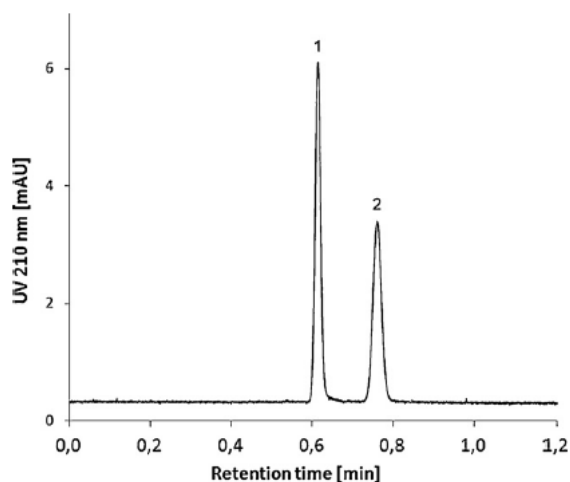


Fig. 2. Chromatogram showing the fastest separation of the test mixture used for performance evaluation. 1: uracil (not retained, asymmetry factor: 1.05), 2: propylbenzene (retention factor  $k=0.25$ , asymmetry: 1.03) employing a  $15\ \mu\text{m}$  ID OT capillary at elevated pressure and flow rate. Chromatographic conditions are as follows: column length: 3 m; temp.: ambient; detector cell: 3 nL, operated at 210 nm; column pressure drop: 290 bar; eluent: water/acetonitrile 40/60 (v/v) in isocratic mode; injection volume: approx. 300 pL (1.0  $\mu\text{L}$  full loop mode, split ratio approx. 1:3300). Linear flow rate was calculated at 81.4 mm/s, volumetric flow rate at approx. 750 nL/min. Sample concentration was 0.4 mg/mL (uracil) and 1.4  $\mu\text{L}$ /mL (propylbenzene).

plate) are used to compare efficiency of different kinds of stationary phase materials. The minimum of this curve is often taken as a performance benchmark of the individual column tested. Both monolithic and particle packed reference capillaries exhibit a minimum plate height of 6–7  $\mu\text{m}$ , the OT column shows an HETP of 19  $\mu\text{m}$ . The slope of the region of the HETP/ $u$ -curves at higher flow rates (increasing contribution of mass transfer limitation to HETP) is best for the monolithic capillary, which means it can be operated at high flow rates with fewest loss of efficiency. The slope of the OT capillary is comparably steep, which arguably means that the ID of  $15\ \mu\text{m}$  is still too large for high speed separations. This most likely can be improved by the fabrication of  $10\ \mu\text{m}$  silica OT capillaries. Separations at low speed show best performance, but retention times up to hours are hardly acceptable for real-world applications.

Table 2  
Complete chromatographic data of test mixture separation using  $15\ \mu\text{m}$  OT sample (3 m length).

$u$ [mm/s]	Uracil (not retained)			Propylbenzene ( $k: 0.25$ )		
	RT [min]	AS	TP	RT [min]	AS	TP
81.4	0.61	1.05	9282	0.76	1.03	5807
40.9	1.22	1.02	17,632	1.55	1.03	10,749
26.0	1.92	1.02	28,383	2.41	1.02	18,534
23.4	2.14	1.03	29,847	2.71	1.03	18,747
21.0	2.38	0.99	34,561	3.01	1.01	21,495
18.2	2.75	1.00	38,713	3.47	1.02	25,122
15.9	3.14	1.05	38,581	3.89	1.04	27,427
14.1	3.55	1.09	42,485	4.42	1.07	30,110
10.1	4.95	1.11	52,620	6.20	1.04	40,329
7.0	7.15	1.03	69,588	8.97	1.05	55,195
3.4	14.53	1.07	107,398	18.23	1.07	94,575
1.7	29.21	1.06	131,366	36.94	1.05	148,666
1.5	33.75	1.07	134,811	41.97	1.05	150,665
1.0	50.14	1.06	138,900	64.10	1.08	167,478
0.6	84.79	1.10	135,238	110.18	1.08	154,159

$u$ : linear flow rate; RT: retention time; AS: asymmetry; TP: theoretical plates;  $k$ : retention factor.

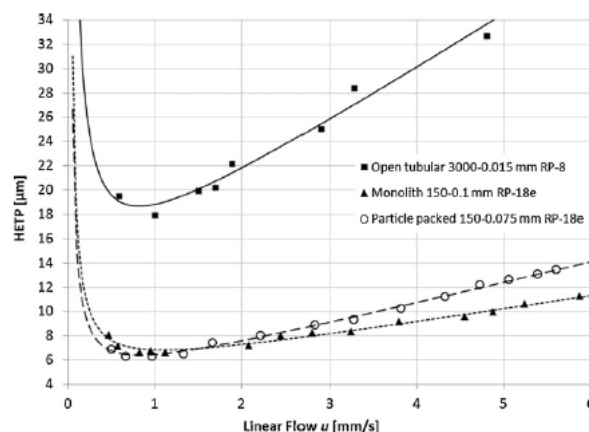


Fig. 3. Van Deemter-plot (not reduced) for a retained compound (propylbenzene,  $k=0.3$ ) employing three different column types. Curves were fitted using the CLR method (classical least square regression).

### 3.3.2. Total plate count

$H/u$ -plots are suitable to assess and compare column performance as long as the column length is more or less the same, which is the case for most of the commercially available analytical HPLC columns. This is mainly due to the need for a fast analysis time. But when it comes to highly permeable columns like OT capillaries (for liquid and gas chromatography), the potential which lies in manufacturing very long columns is not visible when linking column performance to a length equivalent like theoretical plates per meter or corresponding  $H/u$ -plots. Fig. 4 shows the total plate count in the complete flow rate range usable with the OT capillary. Magnification of the low speed region reveals a maximum for reference columns providing total plate numbers of 23,000 and 24,000, respectively. The OT column offers total numbers of theoretical plates multiple times higher within at least part of the complete flow rate range, which is of course due to the great difference in column length. Therefore, in terms of total separation power, the  $15\ \mu\text{m}$  OT capillary is already superior to both monolithic and particulate column. On the other hand, this argument of course cannot be considered true without taking into account the retention time of solutes raising the hypothetical question: "How many plates can be generated in a given analysis time – regardless of how this is achieved". Only

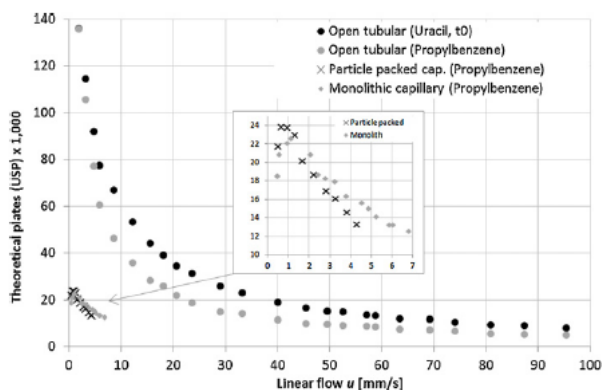


Fig. 4. Total plate count of OT column within complete flow rate range compared to commercially available monolithic and particle packed capillaries. Mobile phase composition (acetonitrile/water) was adjusted for all column types tested to give comparable retention factors for the retained compound (propylbenzene).



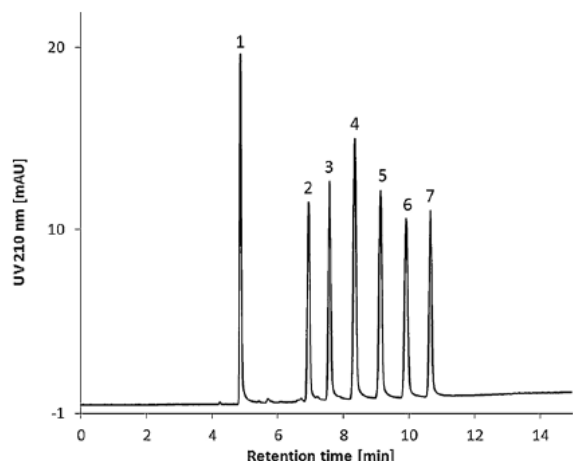


Fig. 5. Gradient separation of 6 alkylbenzenes (1: uracil (not retained, asymmetry (AS): 1.24), 2: toluene (AS: 1.10), 3: ethylbenzene (AS: 1.08), 4: propylbenzene (AS: 1.06), 5: butylbenzene (AS: 1.06), 6: pentylbenzene (AS: 1.06), 7: hexylbenzene (AS: 1.03)). Chromatographic conditions are as follows: column length: 3 m; temp.: ambient; detector cell: 3 nL, operated at 210 nm; column pressure drop: 66 bar; eluent A: water, eluent B: acetonitrile; gradient: 40% B to 80% B in 10 min; injection volume: approx. 1.2 nL (5.0  $\mu$ L full loop mode, split ratio approx. 1:4200). Linear flow rate was calculated at 10.3 mm/s, volumetric flow rate at approx. 95 nL/min. Sample concentration was 0.4 mg/mL (uracil) and 1.4  $\mu$ L/mL (alkylbenzenes).

in this manner, a truly fair comparison between different stationary phase technologies and resulting column designs can be conducted.

### 3.4. Applications

The suitability of the RP-modified OT capillaries in HPLC was investigated via several applications. The bare silica surface, resulting from the sol-gel synthesis, had been modified with a  $C_8$ -silane reagent. Additionally, gradient elution becomes available thereby.  $C_8$  was chosen because of the wider range of analytes than can be injected without undesired irreversible binding onto the stationary phase material surface. In this work, two gradient separation examples are shown involving small molecules at linear flow rates being far away from the "optimal" flow rate determined via the minimum of the HETP/ $u$ -plot (see Fig. 3). Baseline separation of six alkylbenzenes was possible in 11 min (Fig. 5) at a moderate pressure of 66 bar. Peak symmetry was very good with a tailing factor of 1.2–1.0. The linear flow rate in this separation was 10.3 mm/s, thus the omnipresent compromise between analysis time and efficiency being shifted toward a shorter analysis time. However, in case of long 15  $\mu$ m ID OT capillaries, this way of usage is advantageous as it is fully sufficient for simple separations. In addition to a reduction of flow rate, column efficiency could furthermore be improved by simply using even longer capillaries or, as already mentioned, by downsizing capillary ID. The second application example shows the separation of a mixture of 32 different pesticides using a linear acetonitrile gradient within 30 min (Fig. 6). Dead volume was calculated by the elution time of uracil. 23 Peaks were obtained showing reasonable retention factors  $k$  of up to 4.3 for the last eluting compound of this mixture. Of course this particular separation can be superior performed using standard chromatographic columns like 4.6 mm ID packed beds, but the relatively short OT column applied in this work and operated at only 58 bar already provided an adequate separation. This demonstrates the applicability of this new type OT capillary in reversed phase mode using standard nano LC instrumentation and UV detection.

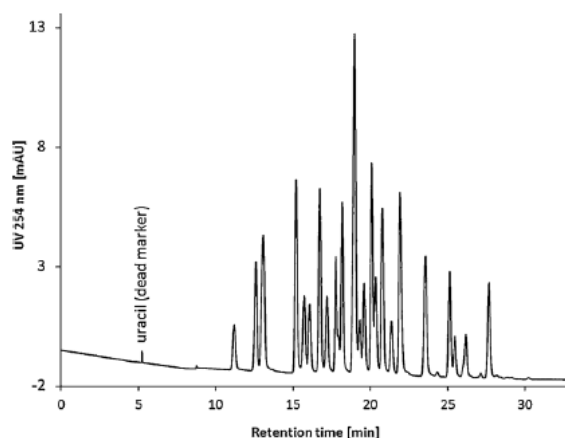


Fig. 6. Gradient separation of 32 pesticides (e.g. metatoltrien, cyanazine, isoprothion, metazachlor, pendimethalin; no peak assignment) showing good peak capacity. Chromatographic conditions are as follows: column length: 3 m; temp.: ambient; detector cell: 3 nL, operated at 254 nm; column pressure drop: 58 bar; eluent A: water, eluent B: acetonitrile; gradient: 2% B to 70% B in 30 min; injection volume: approx. 1.1 nL (5.0  $\mu$ L full loop mode, split ratio approx. 1:4550). Linear flow rate was calculated using the elution time of uracil (5.26 min) at 9.5 mm/s, volumetric flow rate at approx. 88 nL/min. Sample concentration was 50–500  $\mu$ g/mL.

### 4. Conclusion

A new type of thick film OT capillary column of 3 m length with an ID of 15  $\mu$ m was characterized regarding usability, permeability and chromatographic efficiency. Comparison with commercial silica capillary columns revealed very high permeability and a good separation efficiency. The OT column offered an excellent peak shape and a superior total theoretical plate count, however at comparatively long retention times. Experimental data presented in this work demonstrates the potential to manufacture ultrahigh resolution capillaries that can be used with standard LC instrumentation. Further downsizing column ID will yield higher efficiencies at elevated column flow, although maximum column efficiency (minimum of van Deemter-plot) might not be improved. Further detailed experiments are required that allow one to determine the kinetic performance as a function of column IDs with varying layer thicknesses to assess the real, utilizable performance gain of these columns. It seems that OT column development should be driven toward high pressure separations employing capillaries with an ID that is just feasible in terms of synthesis procedure and peak detection. Possible fields of use involve sample limited methods, as is the case i.e. in proteomics research requiring very high peak capacities.

### References

- [1] K. Hibi, D. Ishii, I. Fujishima, T. Takeuchi, T. Nakanishi, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 1 (1978) 21.
- [2] G. Guiochon, Anal. Chem. 53 (1981) 1318.
- [3] J.H. Knox, J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 453.
- [4] R.P.W. Scott, J. Chromatogr. 517 (1990) 297.
- [5] G. Desmet, S. Eeltink, Anal. Chem. 85 (2013) 543.
- [6] T.J. Causon, R.A. Shellie, E.F. Hilder, G. Desmet, S. Eeltink, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8388.
- [7] Y. Shen, R. Zhao, S.J. Berger, G.A. Anderson, N. Rodriguez, R.D. Smith, Anal. Chem. 74 (2002) 4249.
- [8] P.P.H. Tock, P.P.E. Duijsters, J.C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. 506 (1990) 185.
- [9] R. Swart, J.C. Kraak, H. Poppe, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 332.
- [10] Q. Luo, G. Yue, G.A. Valaskovic, Y. Gu, S.-L. Wu, B.L. Karger, Anal. Chem. 79 (2007) 6174.
- [11] G. Yue, Q. Luo, J. Zhang, S.-L. Wu, B.L. Karger, Anal. Chem. 79 (2007) 938.
- [12] D. Thakur, T. Rejtar, D. Wang, J. Bones, S. Cha, B. Clodfelder-Miller, E. Richardson, S. Binns, S. Dahiya, D. Sgroi, B.L. Karger, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8168.
- [13] P.P.H. Tock, C. Boshoven, H. Poppe, J.C. Kraak, J. Chromatogr. 477 (1989) 95.



- [14] P.P.H. Tock, G. Stegeman, R. Peerboom, H. Poppe, J.C. Kraak, K.K. Unger, *Chromatographia* 24 (1987) 617.
- [15] A.L. Crego, J.C. Díez-Masa, M.V. Dabrio, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1615.
- [16] F. Detobel, H. Eghbali, S. De Bruyne, H. Terryn, H. Gardeniers, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7360.
- [17] F. Detobel, S. De Bruyne, J. Vangelooen, W. De Malsche, T. Aerts, H. Terryn, H. Gardeniers, S. Eeltink, G. Desmet, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7208.
- [18] W. De Malsche, S. De Bruyne, J. Op De Beek, S. Eeltink, F. Detobel, H. Gardeniers, G. Desmet, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2010.
- [19] Y. Suzumura, K. Kanamori, K. Nakanishi, K. Hirao, J. Yamamichi, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 94.
- [20] H. Tanaka, *J. Phys. Condens. Matter.* 13 (2001) 4637.
- [21] S. Forster, H. Kolmar, S. Altmaier, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 88.



---

### 2.3. Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10-20 micron open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography

#### Authors:

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b</sup>

#### Institutions:

<sup>a</sup>Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>b</sup>Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

#### Bibliographic data:

Journal of Chromatography A, 2013, 1315, 127-134.

DOI: 10.1016/j.chroma.2013.09.059

Received: June 21<sup>st</sup>, 2013

Received in revised form: September, 15<sup>th</sup> 2013

Accepted: September 16<sup>th</sup> 2013

Published online: September 19<sup>th</sup> 2013

#### Keywords:

open tubular chromatography

fused silica capillaries

silica sol-gel chemistry

kinetic plot limitation

normal phase mode

#### Short summary:

Synthesis of new 10 µm ID variants is described and chromatographic efficiency is compared to commercial reference capillaries in terms of kinetic plot limitation (KPL) in normal phase mode.

#### Link:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313015264>

Reproduced by permission of Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

# Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10–20 $\mu\text{m}$ open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography

Simon Forster<sup>a,b</sup>, Harald Kolmar<sup>a</sup>, Stephan Altmaier<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt, Germany<sup>b</sup> Merck KGaA, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 June 2013

Received in revised form

15 September 2013

Accepted 16 September 2013

Available online 19 September 2013

## Keywords:

Open tubular chromatography

Fused silica capillaries

Silica sol–gel chemistry

Kinetic plot limitation

Normal phase mode

## ABSTRACT

It is well-known that the open tubular column design basically can offer very high plate numbers. Experimental realization has however not kept pace with theoretical considerations, lacking efficient methods for the deposition of a thick film porous layer within a microbore capillary. A previously published sol–gel synthesis method was extended from 20  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$  inner diameter fused silica capillaries and the resulting columns were compared to a monolithic reference capillary in terms of kinetic performance at pressure maximum. Column permeability was investigated and pressure/flow-diagrams were obtained with a 400-fold permeability gain for the open tubes. Structural characterizations regarding layer thickness and surface porosity were carried out and displayed via scanning electron microscopy and nitrogen sorption analysis. Chromatographic results in normal phase mode at elevated mobile phase flow rate reveal the intrinsic performance potential of this column format when it comes to kinetic performance limitation plots, which were constructed for all columns prepared and compared to the monolithic silica reference capillary.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The open tubular (OT) column format features several meters long and  $\mu\text{m}$ -diameter scaled fused silica capillaries with a stationary phase covalently attached to the inner wall. In gas chromatography (GC), this kind of column technology is long-established and dominates current-day GC applications [1]. In liquid chromatography (LC), some major drawbacks have, until today, prevented its prevalence. Among these, primarily instrument related constraints, such as handling of nano flow rates, sub-microliter sample injection and detection limitation, researchers had been struggling with in the 70s to the 90s of the last century. Today, modern LC equipment easily provides the handling of low nano flow setups in combination with very small nanoliter sized UV cells or electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) detection [2]. The potential performance advantage when employing OT capillaries in LC has already been demonstrated theoretically some 30 years ago by several authors [3–6]. This consideration has recently been expanded by a thick-film consideration in 2011 by Causon et al. [7]. Due to the commonly quite similar liquid phase diffusion coefficients of solutes in the mobile

and porous silica stationary phase, LC columns can afford a comparably thick stationary phase layer compared to its GC equivalents [8]. Despite a resulting and unavoidable trade-off between loadability and efficiency, it is unquestioned and has been reviewed recently by Desmet and Eeltink [9], that the OT column design in principle can generate chromatographic efficiencies being superior to packed and monolithic columns. This is mainly due to its very small contribution of eddy dispersion to band broadening contribution and its higher permeability. The result of this combination is a very low minimal separation impedance  $E_{\text{min}}$ , which can be used to determine the minimal time needed to achieve any given plate number (also called kinetic performance). By doing so, column efficiency can not only be judged in the most common way based on the “height equivalent of a theoretical plate” (HETP) concept, but also based on a “time equivalent of a theoretical plate” (TETP) term [10]. The first kinetic plot was already published in 1965 by Giddings [11] and is expressed by plotting the analysis time needed versus the plate number achieved. This kind of data presentation is much more suitable to compare different kinds of stationary phases and column geometries, i.e. OT capillaries, than the more commonly used Van Deemter-plot comparison. Unfortunately, the kinetic plot-concept had never become very popular throughout the more practically oriented chromatographers, as it required an iterative, computer-based strategy to construct these plots [12]. In 2005, Desmet et al. provided a method to combine experimental

\* Corresponding author. Tel.: +49 6151 72 2522; fax: +49 6151 72 912522.

E-mail address: [stephan.altmaier@merckgroup.com](mailto:stephan.altmaier@merckgroup.com) (S. Altmaier).

$H/u$  (Van Deemter plot) and permeability data to create the kinetic plot in a much easier way [13]. This led to a widespread use of the tool with its applications being summarized recently [12]. In this work, experimental OT results are for the first time presented by means of a kinetic plot limitation (KPL) comparison.

One of the major constraints that also has prevented silica-based OT capillaries from being developed further is the lack of efficient methods for the preparation of homogeneous, porous and thick film layers suitable as stationary phases, hence offering a sufficient mass load ability. Early attempts in this field by pre-treating pre-gelled polysiloxanes [14], by using thick film polyacrylates [15] and via the in situ polycondensation of silanol precursors [16] resulted in a low performance or poor retention due to low porosity of the surfaces obtained. Siloxane precursors like tetramethoxysilane (TMOS) and methyltrimethoxysilane (MTMS) are routinely employed in a sol–gel reaction to undergo polycondensation and result in sponge-like bimodal porous materials, a process that has been commercialized by Merck KGaA in 2000 [17]. Already in 2004, Kanamori et al. pointed out that a modification of this reaction can generate layer-like structures at the inner wall of capillaries, when the inner diameter of the (capillary) template is substantially decreased [18]. However, the authors did not make use of their results in terms of OT chromatography. As this wetting phenomenon can be utilized in any so called confined space, as i.e. narrow capillaries are, the Desmet group applied this technique for the deposition of a porous layer on micropillar-distant, etched silicon wafer chips, which were furthermore employed for chip-LC [19–21]. In the last two years, research on TMOS sol–gel chemistry in the confined space of narrow capillaries for the preparation of silica OT columns has been carried out [22,23]. We herein report on the synthesis and chromatographic characterization of new 10  $\mu\text{m}$  ID fused silica capillaries at high pressure, applying the KPL-method described above.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Tetramethoxysilane, urea, poly(ethylene oxide) (MW 10,000) and ethanol were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Deionized water was further purified with a MilliQ Academic 0.22  $\mu\text{m}$  Water System (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For the production of 0.01 M acetic acid a Titrisol pack (Merck KGaA) was diluted with water to obtain 5 L of solution. HPLC solvents (*n*-heptane and 1,4-dioxane) and samples (toluene, nitrobenzene, 2-nitroanisole) were purchased from Merck KGaA and used as received without any further purification.

### 2.2. Preparation of the capillary column

The manufacturing process has been described elsewhere [22]. Briefly, fused silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with IDs of 10–20  $\mu\text{m}$  were cut to a length of 3 m and used as received. A mixture of poly(ethylene oxide) and urea (as listed in the results chapter) was dissolved in 100 mL 0.01 M acetic acid and cooled to 5 °C in a waterbath. Corresponding volume of tetramethoxysilane (TMOS) was added and the solution was stirred at 5 °C for 30 min. The capillary was filled with the sol by means of an LC-pump operated at 400 bar in constant-pressure mode at room temperature. Subsequently, the ends were sealed with a rubber and then stored at 25 °C for 20 h. Fine-tuning of mesoporosity was performed using a hydrothermal treatment at 110 °C. The columns were flushed with water (1 h) to remove in situ generated ammonia. Finally, the capillaries were flushed with acetonitrile and subsequently with *n*-heptane for normal phase equilibration.

### 2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs were obtained using a ZEISS Leo Supra 35 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) instrument, equipped with a field emission cathode, operated at 5 kV acceleration voltage. Capillaries were platinum-sputtered with a thickness of 5 nm prior to image acquisition. Layer thickness was determined by measuring the SEM images in the acquisition software (Leo-32, version 4.0) with an estimated deviation of approximately 5%.

### 2.4. Nitrogen sorption

All nitrogen sorption experiments were conducted at 77 K utilizing an ASAP 2420 and supplied software version 1.03a from Micromeritics (Norcross, GA, USA). Before analysis approximately 0.1 g of each sample is being degassed under vacuum to remove adsorbed matter. For this purpose the material is stepwise being heated to 250 °C over a period of approximately 3 h and kept at constant temperature for another 4 h. Mesopore size distributions were calculated from the adsorption branch of the isotherm utilizing the method of Barrett, Joyner and Halenda (BJH), specific surface areas were determined by applying the Brunauer–Emmet–Teller (BET) method utilizing data points in the  $p/p_0$  range of 0.1–0.4.

### 2.5. Chromatography

Chromatographic testing was performed using a Dionex Ultimate 3000 nano LC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with a 3 nL UV detector cell. In order to avoid band broadening caused by pre-column dead volume, a flow split between the OT capillary and the injection port was assembled (JR-BPR2, Vici, Switzerland). Pre-column flow rate was set to 2.5 mL/min, for lowest pre-column time. The OT capillary end was directly connected to the UV cell inlet capillary using a teflon sleeve (250  $\mu\text{m}$  ID, Thermo Fisher Scientific). Normal phase chromatography was conducted with *n*-heptane/1,4-dioxane as eluents in isocratic mode. Acquisition and post-run analysis was carried out with Chromeleon software (version 6.8, Thermo Fisher Scientific). Volumetric flow rates were calculated by dividing the retention time of the unretained solute by the overall volume (detector extra column volume + empty capillary inner volume – layer volume). Column permeability  $K_v$  was assessed according to the Darcy equation.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Comparison between 10 and 20 $\mu\text{m}$ ID capillaries

#### 3.1.1. Permeability

The intrinsic feature of OT column design is the substantially reduced backpressure when compared to columns comprising monolithic or particle packed stationary phases. In our previous publication, the pressure/flow-characteristic of a 15  $\mu\text{m}$  ID OT reversed phase variant was compared to commercial capillary columns of 15 cm in length [23], revealing an increase in specific permeability  $K_v$  for the OT column by a factor of 178, compared to the monolith and 413, compared to the particle packed capillary [23]. Fig. 1 shows a pressure/flow diagram of three OT columns, differing from each other in the inner diameter of the empty capillary employed. The data clearly demonstrates the strong relationship between the geometry of the flow-channel and corresponding backpressure in a qualitative manner, as of course backpressure is increased quadratically when column ID is increased in a linear



**Table 1**

Selected chromatographic data of all column types tested (10–20  $\mu\text{m}$  ID OT capillaries and monolithic reference column (Si, 15 cm, 100  $\mu\text{m}$  ID)). Mobile phases were adjusted to give comparable retention factors: for OT columns: *n*-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v); for reference column: *n*-heptane/1,4-dioxane 98/2 (v/v). *l*, length; *p*, pressure; *v*, calculated volumetric flow rate (see Section 2.5), *u*, linear flow rate, *K<sub>v</sub>*, permeability; RT, retention time; AS, asymmetry (USP), TP, theoretical plates, HETP, height equivalent to a theoretical plate.

	<i>l</i> [m]	<i>p</i> [bar]	<i>v</i> [nL/min]	<i>u</i> [mm/s]	<i>K<sub>v</sub></i> [ $10^{-14} \text{m}^2$ ]	Nitrobenzene ( <i>k</i> = 0.2)				2-Nitroanisole ( <i>k</i> = 0.7)			
						RT [min]	AS	TP	HETP [ $\mu\text{m}$ ]	RT [min]	AS	TP	HETP [ $\mu\text{m}$ ]
OT 20 $\mu\text{m}$ ID	3.0	55	600	35.4	745	1.70	1.04	18,730	160	2.62	1.01	8070	372
	3.0	98	1040	61.4	726	0.98	1.03	10,500	286	1.51	1.04	4370	686
	3.0	243	2470	145.0	691	0.42	1.03	3920	765	0.65	1.05	1700	1765
OT 15 $\mu\text{m}$ ID	3.0	58	210	23.2	463	2.57	0.99	53,370	56	3.96	1.01	20,490	146
	3.0	163	600	64.5	458	0.92	1.07	15,660	192	1.41	1.03	7600	395
	3.0	330	1120	122.0	428	0.49	1.05	7800	385	0.75	1.04	3890	771
OT 10 $\mu\text{m}$ ID	3.0	190	80	22.1	135	2.58	1.08	24,260	124	3.64	1.12	32,380	93
	3.0	294	120	32.4	128	1.76	1.11	22,680	132	2.49	1.10	25,500	118
	3.0	337	140	36.2	124	1.58	1.09	22,320	134	2.23	1.10	24,010	125
Si Monolith	0.15	38	420	1.1	1.7	2.62	1.06	15,990	9	3.65	1.28	16,800	9
	0.15	145	1060	4.2	1.7	1.04	1.10	5100	29	1.45	1.21	8510	18
	0.15	228	2560	6.4	1.6	0.43	1.07	3520	43	0.61	1.17	6077	25

way. Values for specific permeability *K<sub>v</sub>* are listed in Table 1 and are obtained applying the Darcy equation:

$$K_v = \frac{u \cdot \eta \cdot l}{\Delta p} \quad (1)$$

where *u* is the linear flow rate,  $\eta$  the dynamic viscosity of the mobile phase composition under isocratic conditions (386  $\mu\text{Pa s}$ ), *l* the capillary length and  $\Delta p$  the corresponding back pressure. The resulting average gain factors in OT permeability, compared to the reference capillary column (150 mm normal phase monolithic capillary with 100  $\mu\text{m}$  ID), can be calculated to 76 (10  $\mu\text{m}$  ID), 264 (15  $\mu\text{m}$  ID) and 424 (20  $\mu\text{m}$  ID).

### 3.1.2. Chromatographic performance in comparison to monolithic reference capillary

All chromatographic separations for performance evaluation were carried out under isocratic normal phase conditions using a mixture of *n*-heptane and 1,4-dioxane as the mobile phase. Retention factors on the monolithic reference column were significantly higher compared to the OT columns, which is probably due to the thicker silica skeleton and larger corresponding available stationary phase surface (data not shown). For this reason, mobile phase

composition was adjusted to give comparable retention factors for all columns tested. The chromatographic results, listed in Table 1, exhibit a very good peak shape (asymmetry 1.0–1.1) for all column types tested, indicating minimal contribution of unswept post-column dead volume to band broadening and tailing related to the detector capillary connection. The UV cell employed had a Z-like flow cell with an inner volume of only 3 nL, which is the smallest variant available for the instrument used. All column types were tested at various flow rates up to the pressure maximum, which was set to 200 bar for the monolith (manufacturer specification) and approx. 350 bar (instrument limitation) for the OT columns. Corresponding HETP values for the exemplary data shown in Table 1 at first sight suggest a superior performance of the monolithic capillary in terms of plate count per length equivalent, providing a plate height of close to 9  $\mu\text{m}$  (Van Deemter minimum) for the slowest chromatographic run at 1.1 mm/s. As already addressed in the introduction, different column designs should not be compared by HETP data, but based on more practically relevant questioning: “How much time is required for the generation of a particular plate number?” By doing so, each peak of the chromatogram can be transferred to a *tp/s*-value by simply dividing its plate number by its retention time. Each bar in Fig. 2 represents one specific peak from the separation of toluene (A–D, unretained) from nitrobenzene (E–H, *k* = 0.2) and 2-nitroanisole (I–L, *k* = 0.7). The diagram clearly exhibits the dependency of kinetic performance on OT column ID, when it comes to stronger retention. The decay in efficiency for the 20  $\mu\text{m}$  ID variant (A, E and I) represents the inherent OT manufacturing trade off between operability and performance expectation. 15 and 20  $\mu\text{m}$  ID OT columns can be manufactured (and operated) quite easily, but will lack efficiency under retained conditions owing to liquid phase mass transfer limitation (C-term of the Van Deemter-equation). At ambient temperature, only the 10  $\mu\text{m}$  ID variant (C, G and K) provides sufficient *tp/s*-values even at high velocities for the last eluting compound. Compared to the reference capillary, values for 2-nitroanisole are actually higher (180 vs. 120 *tp/s* at pressure maximum).

### 3.1.3. Kinetic plot limitation at pressure maximum

For it is well-known that the kinetic performance of any free length column type is best at its pressure maximum [24], a kinetic performance limit (KPL)-plot was created according to the method described by Desmet et al. [13]. For this reason, the most retained peak (2-nitroanisole, *k* = 0.7) was further investigated by transforming experimental chromatographic data from Table 1 for each

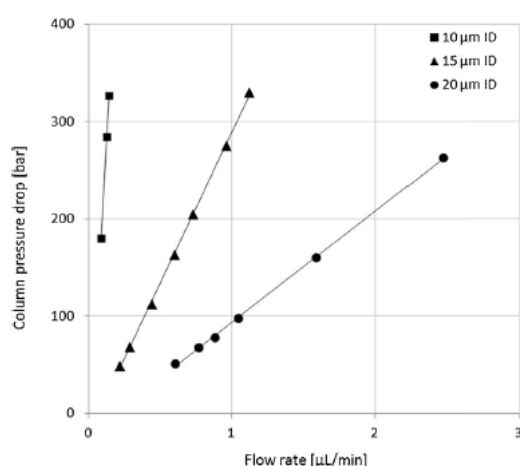


Fig. 1. Pressure/flow-diagram of three OT capillaries with varying IDs (circles: 20  $\mu\text{m}$ , triangles: 15  $\mu\text{m}$ , squares: 10  $\mu\text{m}$ ). Mobile phase was *n*-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v). Volumetric flow rates were calculated as indicated in Section 2.5.



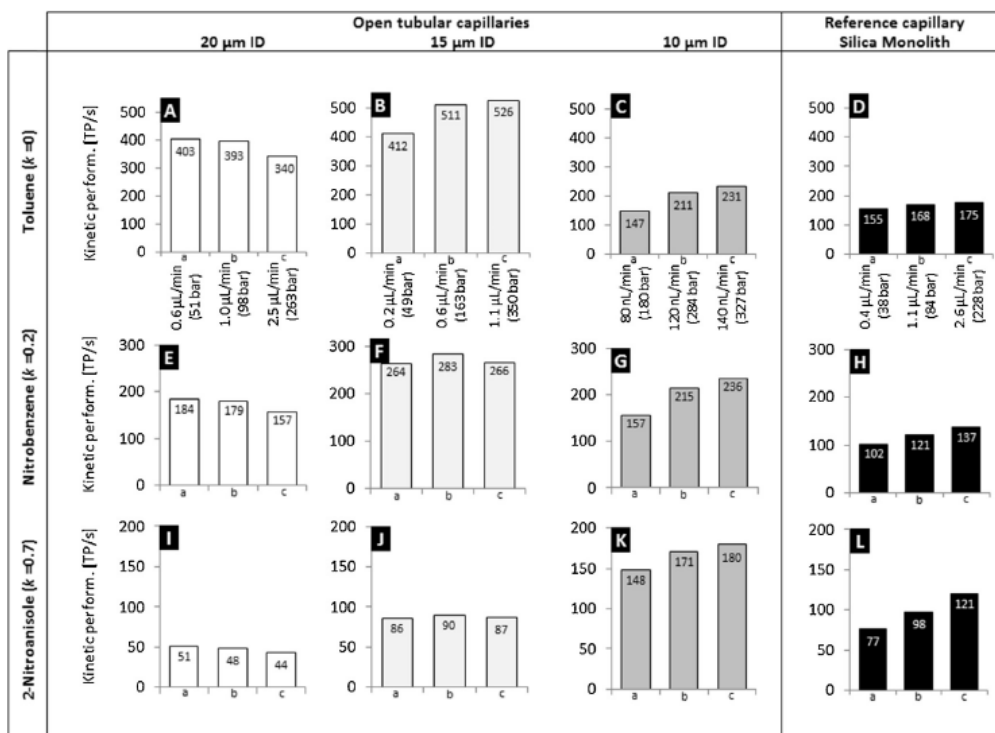


Fig. 2. Bar diagrams showing kinetic performance (in terms of theoretical plates per second (TP/s)) of differently sized OT columns (white/grey) and the monolithic silica reference column (black). Chromatographic conditions were as follows: mobile phase, OT: *n*-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v), reference: 98/2 (v/v) in isocratic mode; column length: 3.0 m (OT), 15.0 cm (reference); pressure drop and corresponding calculated flow rates as indicated in the top bar diagram; injection volumes: 1.0 μL (before split). Each vertical column (i.e. Aa/Ea/la) represents the analysis of the peaks of toluene, nitrobenzene and 2-nitroanisole within one chromatogram.

chromatogram into a new set of variables ( $N_{eff}$  and  $t_R$ , Eqs. (2) and (3)):

$$N_{eff} = \frac{\Delta p_{max}}{\eta} \left( \frac{k_0}{uH} \right) \left( \frac{k}{1+k} \right)^2 \quad (2)$$

$$t_R = \frac{\Delta p_{max}}{\eta} \left( \frac{k_0}{u^2} \right) (1+k) \quad (3)$$

$N_{eff}$  is the dimensionless column efficiency and  $t_R$  is the retention time that is needed to achieve  $N_{eff}$ .  $\Delta p_{max}$  is the column pressure limit and has been set to 200 bar for the monolith (manufacturer specification) and to 350 bar for the OT columns (instrument limitation).  $\eta$  is the dynamic mobile phase viscosity,  $K_p$  is the (experimental) specific permeability,  $H$  is the (experimental) plate height,  $u$  is the linear mobile phase velocity and  $k$  is the retention factor. The resulting diagram, shown in Fig. 3, can be used to reveal the shortest possible analysis time for any given efficiency, by varying column length and thus consequently operating at the given pressure maximum. Therefore, it is not possible to achieve higher efficiencies for a given analysis time (and vice versa) with the column investigated, as the curves in Fig. 3 represent the optimum regarding column length and mobile phase flow rate at any (calculated or experimental) data point. As it is of course desirable to get the highest plate count in the shortest time possible, columns at the lower right region of the diagram in Fig. 3 are thus beneficial in terms of their kinetic performance. In this regard, it turns out that the 15 μm ID OT column is about equivalent to the monolithic reference capillary, but the 20 μm ID variant substantially lacks efficiency, although providing the highest permeability. The reason for this is of course the already mentioned C-term limitation due to the very high “flow-through-pore”-diameter for retained analytes.

Consequently, the new 10 μm ID variant comes out with the highest kinetic performance of all columns tested under the experimental conditions described above. All three pairs of values extracted from the chromatographic raw data set, are below the plot of the reference column and the bigger sized OT columns. Despite the user-given pressure limit somewhat does affect  $N_{eff}$  and  $t_R$  (even though not crucial), and therefore the monolith is at a small inherent disadvantage, the data still clearly points out the associated efficiency gain when downsizing OT capillary ID.

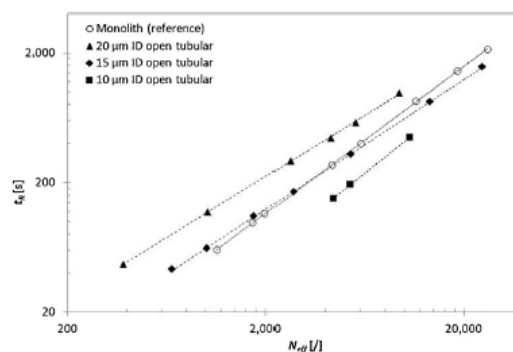


Fig. 3. Calculated kinetic performance limit (KPL)-plot for the solute 2-nitroanisole ( $k=0.7$ ) on various OT capillaries and the monolithic reference column (circles). Values for  $t_R$  and  $N_{eff}$  are obtained via Eqs. (1) and (2) (values for experimental permeability  $K_p$  are indicated in Table 1). Calculations were performed using an operation limit  $p_{max}$  of 200 bar for the monolith and 350 bar for the open tubular columns, respectively. Experimental values for  $H$  (ETP) and  $u$  are listed in Table 1. For a more detailed explanation the reader is referred to the text.

**Table 2**

Synthesis variation and resulting structural properties of 10  $\mu\text{m}$  ID OT variants prepared in this work. Surface area and mesoporosity measurements were calculated from nitrogen sorption data (see Section 2.4); layer thickness was determined by SEM image measurement. AcOH, acetic acid; PEO, poly(ethylene)oxide; TMOS, tetramethoxysilane.

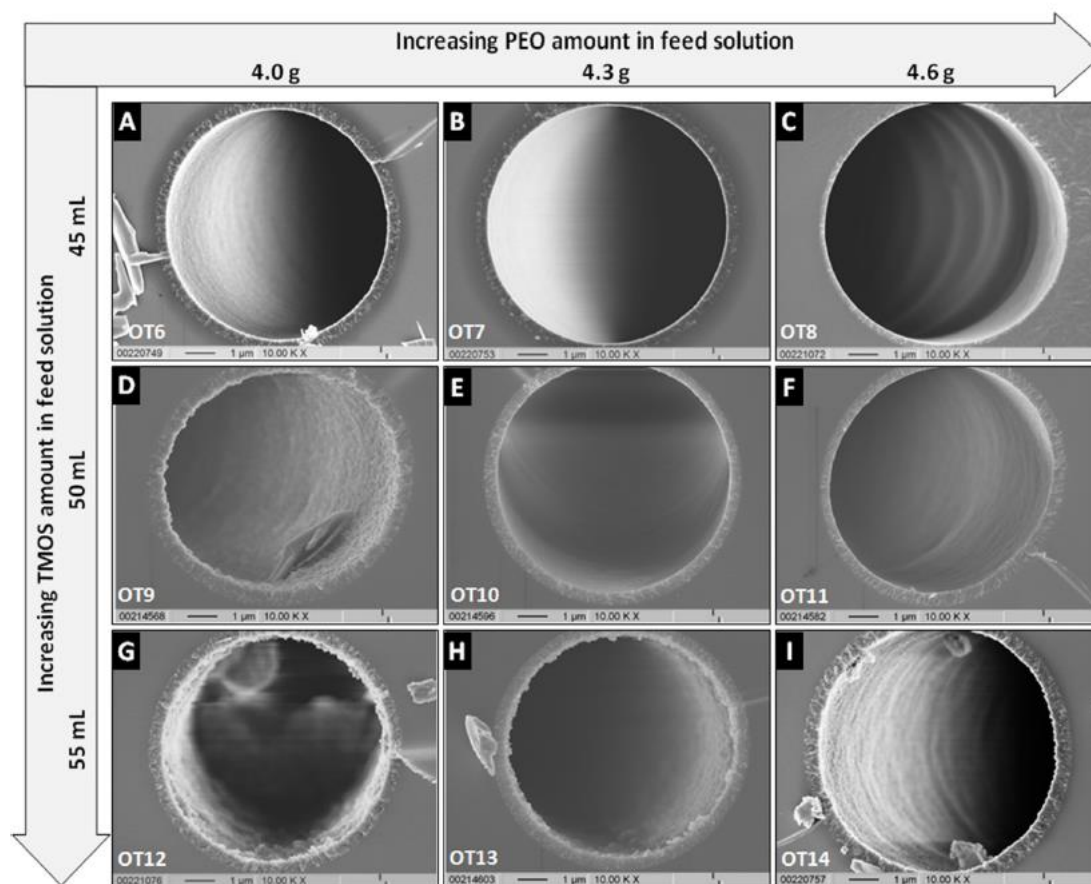
	AcOH [mL]	Urea [g]	PEO [g]	TMOS [mL]	Surface area [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	Mesoporosity [nm]	Layer thickness [nm]
OT6	100	8	4.0	45	214	10.3	420
OT7	100	8	4.3	45	212	10.7	320
OT8	100	8	4.6	45	221	10.3	230
OT9	100	8	4.0	50	223	10.6	590
OT10	100	8	4.3	50	235	10.0	440
OT11	100	8	4.6	50	224	10.1	480
OT12	100	8	4.0	55	234	9.5	570
OT13	100	8	4.3	55	224	9.6	460
OT14	100	8	4.6	55	241	9.9	460

### 3.2. New 10 $\mu\text{m}$ ID variants

#### 3.2.1. Synthesis and structural characterization

In view of the results from chapter 2 (comparison of differently sized OT capillaries), a batch of new 10  $\mu\text{m}$  ID variants was synthesized for an investigation of the feed composition and corresponding layer thicknesses. OT variants OT6–OT14 differ in their feed concentration concerning silane precursor (TMOS) and porogen (PEO), as indicated in Table 2 (synthesis mixture for OT10 was used for capillary preparation of 20, 15 and 10  $\mu\text{m}$  ID variants). The amount of urea in the sol was kept constant (8.0 g in 100 mL solution), therefore the ratio of urea to TMOS varied. This ratio basically determines the resulting pore structure during the

temperature treatment step at elevated pH (thermal decay of urea to ammonia and carbon dioxide) and corresponding, partial dissolution and rearrangement of the silica surface (Ostwald ripening). According to this, the variants OT6, OT7 and OT8 should exhibit the largest average mesopore size (10.4 nm) and, correspondingly, the lowest average surface area (216  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Values obtained from variants OT12, OT13 and OT14 (9.7 nm, 233  $\text{m}^2/\text{g}$ ) are in line with this theoretical consideration (variants OT9, OT10 and OT11 are in between). Unfortunately, silica surface characterization data such as specific surface area and mesopore size from nitrogen sorption experiments cannot be obtained from a piece of the capillary itself (because of far too little porous material inside the capillary). Therefore, a bulk monolith was prepared in parallel for each OT variant



**Fig. 4.** Cross-section SEM images of 10  $\mu\text{m}$  ID OTs resulting from nine different feed compositions (as listed in Table 2). Scale bars correspond to 1  $\mu\text{m}$ . From top left to bottom right both PEO and TMOS concentration is increased for samples OT6 (A) to OT14 (I) (as indicated by the arrows).



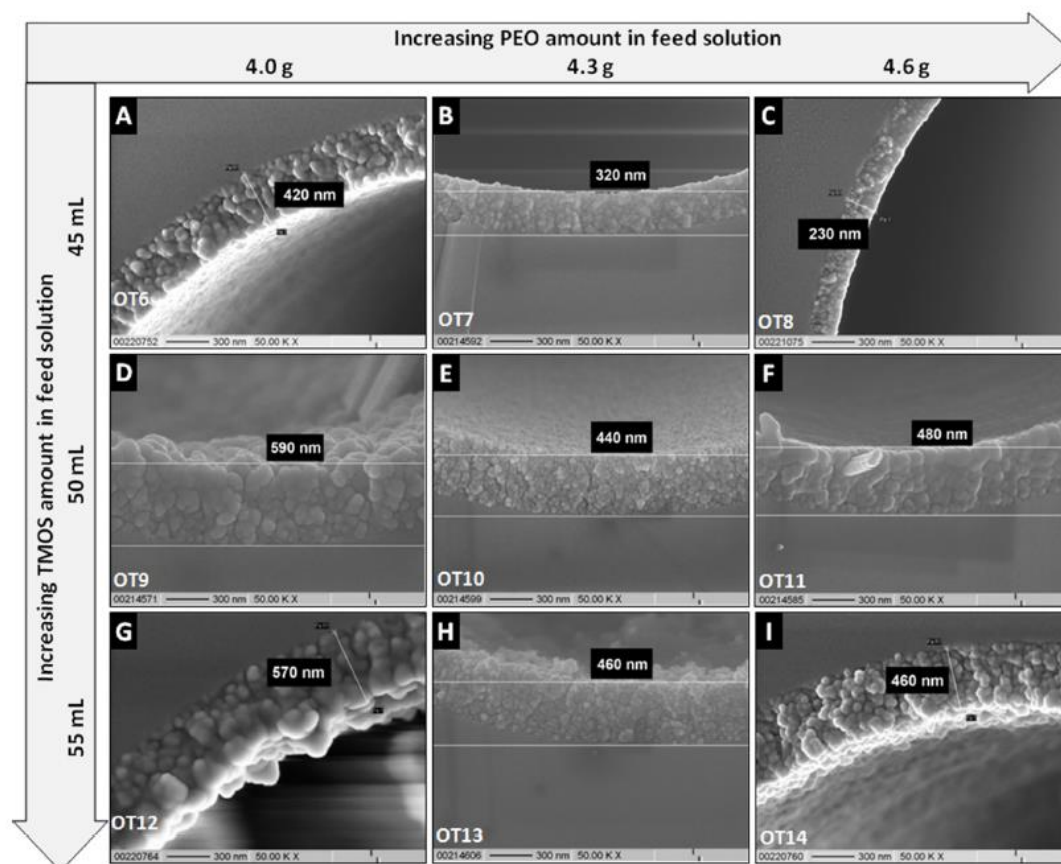


Fig. 5. Additional close-up cross-section SEM images displaying the layer geometry and dimension of 10 µm ID OT variants. The thickness of the porous silica layer was measured and annotated. Scale bars correspond to 300 nm.

and was used for nitrogen sorption analytics exclusively. Structural investigation of the silica layer concerning its thickness was carried out with a short piece of capillary by SEM imaging. Fig. 4 shows the overview cross-sections of OT6–OT14 (scale bar 1 µm), Fig. 5 the close-up cross-sections (scale bar 0.3 µm) with corresponding layer thickness. Both an increase in the amount of PEO and TMOS seem to be beneficial towards generating a thicker layer. Unfortunately, columns with higher PEO amount tend to become clogged and thus unusable for chromatography during temperature treatment (and subsequent washing procedure, data not shown). As all

variants show a layer thickness of approx. 500 nm (with the exception of low TMOS variants OT7 (B) and OT8 (C)), it seems not possible to crucially set up layer thickness by a small variation of PEO and/or TMOS amount in the feed composition. Consistency of the layer thicknesses alongside the capillaries (column length 3.0 m) should be investigated (and verified employing multi-syntheses), even though the columns would be destroyed thereby. More data has to be generated in order to investigate this issue further on, preferably in addition to reaction temperature variation, which has been set to 25 °C in this work.

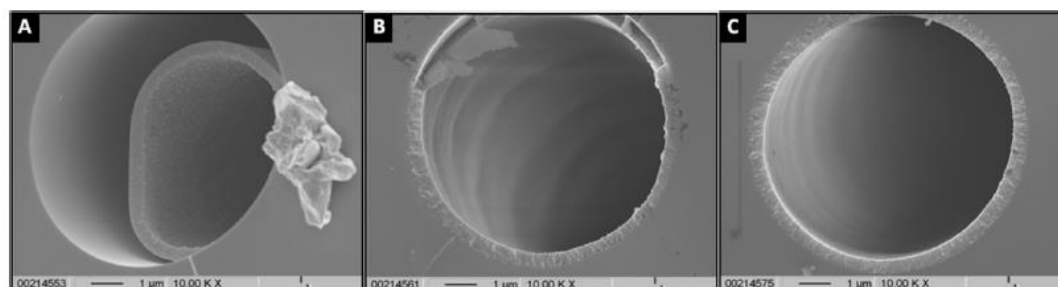


Fig. 6. Cross-section SEM images of a 10 µm ID OT prepared with a sol composition equivalent to OT10. Micrographs were recorded at different stages of the synthesis process: (A) after overnight reaction and before temperature treatment; (B) after temperature treatment and before washing procedure; (C) after completion of synthesis protocol (compare with Fig. 4E). Scale bars correspond to 1 µm.

**Table 3**

Chromatographic data for selected 10  $\mu\text{m}$  ID samples prepared as indicated in Table 2.  $l$ , capillary length;  $p$ , backpressure;  $u$ , linear flow rate;  $K_v$ , permeability (*n*-heptane/1,4-dioxane 95/5 (v/v)); RT, retention time; TP, theoretical plates; HETP, height equivalent to a theoretical plate.

	$l$ [m]	$p$ [bar]	$u$ [mm/s]	$K_v$ [ $10^{-14} \text{m}^2$ ]	RT [min]	TP	HETP [ $\mu\text{m}$ ]
OT7	3	311	37.4	139.3	2.09	25,028	119.9
	3	264	32.8	143.9	2.37	27,131	110.6
	3	195	25.8	153.2	3.02	30,866	97.2
	3	161	22.8	164.0	3.42	33,986	88.3
OT9	3	335	37.7	130.3	1.69	23,933	125.3
	3	273	31.2	133.3	2.05	25,229	118.9
	3	204	24.0	136.2	2.66	28,040	107.0
	3	181	21.6	138.2	2.94	28,942	103.7
OT10	3	88	10.8	142.1	5.90	33,087	90.7
	3	337	36.2	124.4	2.23	24,006	125.0
	3	294	32.4	127.6	2.49	25,501	117.6
	3	190	22.1	134.7	3.64	32,380	92.6
OT11	3	329	32.5	114.4	2.79	28,792	104.2
	3	246	24.5	115.3	3.74	35,136	85.4
	3	225	22.3	114.8	4.05	37,529	79.9
OT13	3	350	36.1	119.4	2.25	30,400	98.7
	3	259	26.2	117.1	3.09	37,267	80.5
	3	212	21.5	117.4	3.71	42,427	70.7
	3	178	17.6	114.5	4.59	46,276	64.8
	3	153	13.8	104.4	5.87	49,894	60.1

Fig. 6 shows the development of the layer structure during complete synthesis protocol (A, dried before temperature treatment; B, dried before washing step; C, after complete synthesis procedure). At the point of time between overnight reaction and temperature treatment (A), the layer seems hardly attached to the inner wall. The homogeneous, wall-fixed layer is apparently being generated at higher temperature (B). Layer thickness, however, is not affected by this step (440 nm).

### 3.2.2. Permeability and kinetic performance evaluation

Fig. 1 showed the dramatic decrease in permeability when capillary ID is downscaled from 20  $\mu\text{m}$  to 15  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$ . The specific permeability  $K_v$  of the new 10  $\mu\text{m}$  variants synthesized in this work (approx.  $10^{-12} \text{m}^2$ ) is still about 100 times higher compared to the permeability of the monolithic reference column ( $10^{-14} \text{m}^2$ ). A pressure/flow-comparison shows slight differences between three 10  $\mu\text{m}$  ID variants (OT7, OT10, OT13, data not shown), which differ in the silica layer thickness (from 320 nm to 460 nm). This issue should however only be used to discuss the layer thickness-dependent permeability in a qualitative way, as the stationary phase longitudinal homogeneity (column length: 3.0 m) was not investigated.

Five 10  $\mu\text{m}$  ID capillaries were furthermore selected for an investigation of the chromatographic efficiency by use of the normal phase test mixture from the previous chapter, the full results being listed in Table 3. Based on the discussion in chapter 3.1, KPL-plots were created and compared to the KPL-plot of the monolithic reference capillary (Fig. 7). For this reason, chromatographic runs were performed particularly at higher pressure because of the general kinetic performance maximum at column pressure limit. Comparing KPL-plots of the 10  $\mu\text{m}$  variants with the reference column, the kinetic performance gain is quite obvious, since KPL-curves for all five OT columns show up below the KPL-curve of the reference monolith. This experimental finding substantially reveals the potential of the OT column format and is in line with theoretical OT characterization [7]. It implies the assumption, that practical chromatographers can utilize their columns best possible by cutting them to the desired length, depending on the efficiency required and constantly operating them at maximum pressure. A postulation, which of course cannot be fulfilled in general with stainless steel columns or particle packed (thus requiring frits)

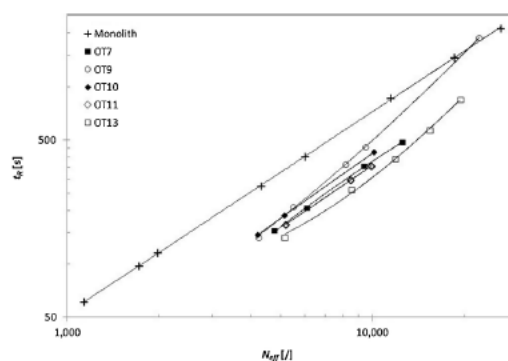


Fig. 7. Calculated kinetic performance limit (KPL)-plot for the solute 2-nitroaniline ( $k=0.7$ ) on selected 10  $\mu\text{m}$  ID OT capillaries in comparison to the monolithic reference column (crosses). Values for  $t_R$  and  $N_{eff}$  are obtained via Eqs. (1) and (2) (values for experimental  $K_v$ ,  $u$  and HETP are shown in Table 3). Calculations were performed using an operation limit  $p_{max}$  of 200 bar for the monolith and 350 bar for the open tubular columns, respectively.

fused silica capillaries. OT capillaries, however, can be synthesized 10 m long (and more), do not require frits and could be cut specifically for any desired application.

## 4. Conclusion

Kinetic plots are well-suited for the analysis of chromatographic efficiency when it comes to uncommon stationary phase designs like OT capillaries. In theory, the performance potential is unquestioned and has been calculated in detail several times. This data shows, to the best of our knowledge, for the first time experimental KPL-plots with OT capillaries. This kind of performance assessment is advantageous compared to the classical plate height comparison, because it involves column permeability which is the key driver for column efficiency in OT capillaries (and any other highly permeable stationary phase type like monoliths). The pressure limitation in this work was set by the LC instrument, therefore the hydrodynamic layer stability at pressures > 350 bar is to be addressed in the future. Using UHPLC equipment, this new 10  $\mu\text{m}$  ID OT generation should be compared with core-shell and sub-2-micron particles of current

interest in terms of kinetic performance. As an ID of even 10  $\mu\text{m}$  is still comparably large to what is predicted in the literature to be the “ideal”, still practical diameter (approx. 5  $\mu\text{m}$ ), one can expect to further improve OT column efficiency by further downsizing column ID. Another approach to reduce the C-term diffusion contribution to band broadening, which is by now the limiting step, could be the operation at elevated temperature, as all chromatographic runs in this work were carried out at 25 °C. Additionally, experiments regarding temperature variation within the synthesis procedure might lead to a more comprehensive understanding of the layer deposition mechanism and potentially could furthermore be used to control/increase the stationary phase thickness. In this respect, sample loadability should be investigated and compared to commercial miniaturized LC systems such as chips or packed microbore capillaries. Necessarily, a surface modification should be carried out to extend the application field to, at least, reversed phase mode. Alternatively, a very straightforward follow-up would be the utilization of the bare silica surface already used in this work for OT-HILIC applications, which is under investigation in our laboratory. In conclusion, even though a lot of issues are still to be addressed, the promising, experimental results from this work allow for a further development, characterization and maybe some day also application of this stationary phase type.

## References

- [1] P.Q. Tranchida, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 23.
- [2] F. Zhou, Y. Lu, S.B. Ficarro, J.T. Webber, J.A. Marto, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5133.
- [3] K. Hibi, D. Ishii, I. Fujishima, T. Takeuchi, T. Nakanishi, *J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.* 1 (1978) 21.
- [4] G. Guiochon, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1318.
- [5] W.M.A. Niessen, H.P.M. van Vliet, H. Poppe, *Chromatographia* 20 (1985) 357.
- [6] J. Jorgenson, E.J. Guthrie, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 335.
- [7] T.J. Causon, R.A. Shellie, E.F. Hilder, G. Desmet, S. Eeltink, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8388.
- [8] P.P.H. Tock, P.P.E. Duijsters, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 506 (1990) 185.
- [9] G. Desmet, S. Eeltink, *Anal. Chem.* 85 (2013) 543.
- [10] H. Poppe, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 3.
- [11] J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 37 (1965) 60.
- [12] K. Broeckhoven, D. Cabooter, S. Eeltink, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 20.
- [13] G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4058.
- [14] P.P.H. Tock, C. Boshoven, H. Poppe, J.C. Kraak, *J. Chromatogr.* 477 (1989) 95.
- [15] R. Swart, J.C. Kraak, H. Poppe, *Chromatographia* 40 (1995) 587.
- [16] A.L. Crego, J.C. Díez-Masa, M.V. Dabrio, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1615.
- [17] K. Cabrera, D. Lubda, H.-M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 93.
- [18] K. Kanamori, H. Yonezawa, K. Nakanishi, K. Hirao, H. Jinnai, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 874.
- [19] F. Detobel, H. Eghbali, S. De Bruyne, H. Terryn, H. Gardeniers, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7360.
- [20] F. Detobel, S. De Bruyne, J. Vangeloooven, W. De Malsche, T. Aerts, H. Terryn, H. Gardeniers, S. Eeltink, G. Desmet, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7208.
- [21] W. De Malsche, S. De Bruyne, J. Op De Beek, S. Eeltink, F. Detobel, H. Gardeniers, G. Desmet, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2010.
- [22] S. Forster, H. Kolmar, S. Altmair, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 88.
- [23] S. Forster, H. Kolmar, S. Altmair, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 110.
- [24] T.J. Causon, K. Broeckhoven, E.F. Hilder, R.A. Shellie, G. Desmet, S. Eeltink, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 877.





---

## 2.4. Simple and fast quantification of capsaicinoids in hot sauces using monolithic silica capillaries and LC/MS

### Cover article

#### Authors:

Simon Forster, Stephan Altmaier

#### Institution:

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

#### Bibliographic data:

LCGC North America, 2013, 31, 218-223.

LCGC Europe, 2013, 26, 326-329.

#### Short summary:

Capsaicinoids were extracted from commercial hot sauces in a sample preparation protocol. Analytes were separated, identified and quantified in a LC-MS-setup. Example of miniaturized, commercial HPLC system in application development.

#### Link:

<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=815146>

Reproduced by permission of Advanstar Communications Inc.

Volume 31 Number 3, 177-264

**LCGC**  
north america  
solutions for separation scientists

Volume 31 Number 3 March 2013  
[www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com)

LCGC NORTH AMERICA

ADVANTAGE  
SCIENCE

March 2013

# Quantification of Capsaicinoids in Hot Sauces Using LC-MS with Monolithic Silica Capillaries

Trends in Sample Preparation  
Intuition and LC Gradient Elution

# Simple and Fast Quantification of Capsaicinoids in Hot Sauces Using Monolithic Silica Capillaries and LC-MS



This work describes the simple and fast quantification of capsaicinoids extracted from diverse hot sauces used to spice up sausages. The various capsaicinoids were separated on a robust reversed-phase monolithic silica capillary column and then directly transferred to a mass spectrometry system. The main analytes obtained via this method and contributing 90% of chili heat were capsaicin and dihydrocapsaicin. Both were analyzed quantitatively in a set of 10 different sauces. The combined results are displayed in Scoville heat units (SHU) and compared to manufacturer's data.

**P**eppers such as chili or jalapeño are long-known and widely used spices with an agricultural history reaching back about 6300 years (1). Originally cultivated in Ecuador, these peppers eventually made their way into kitchens worldwide. Today a wide range of hot peppers is available, with the commercially available pepper Bhut Jolokia holding the world record for plant heat (2).

The heat of food — for example, hot sauces — is defined by its content of several different capsaicinoids, 90% of these being either capsaicin or dihydrocapsaicin. In the very beginning of heat measurement, a slow and inaccurate sensory method introduced by W.L. Scoville was used to define the heat of hot food (3). This method worked with testers tasting a stepwise-diluted sample solution and resulted in a dilution factor today known as Scoville heat units (SHU, see Table I). An SHU value of 5000 for example means that one needs 5000 drops of water to dilute one drop of hot sauce below the human threshold level for heat. For comparison, the SHU of pure capsaicin accounts to 16,000,000.

Nowadays the quantification of capsaicinoids is performed via fast and accurate high performance liquid chromatography (HPLC) techniques coupled to mass spectrometry (MS) (4,5). The capsaicinoid content is given in parts per million (ppm) and can then be converted to the SHU system for ease of use.

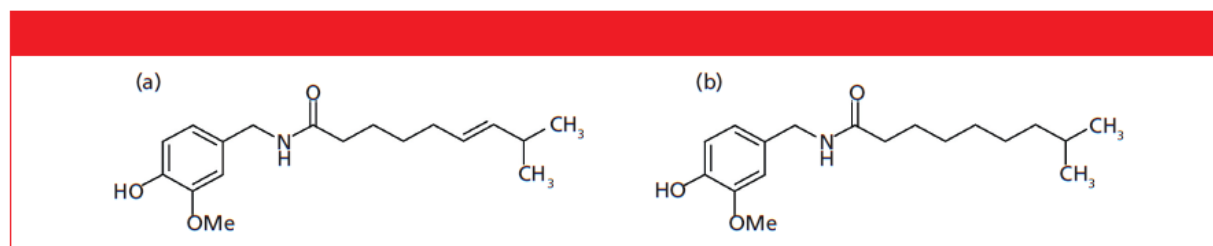
For some years now, the trend of extremely spicy food has been observed. This phenomenon caused the arrival of a growing variety of hot sauces on the shelves of supermarkets and in internet shops. Many of these products do not only contain chili peppers but — to perform well and as expected in tastings — also consist of relevant amounts of chili pepper extracts (oleoresins). Doing so allows for the production of sauces with SHU values up to several million — reminding one more of biological warfare rather than of a candlelight dinner.

In our work, we describe the quantitative capsaicinoid analysis of 10 of these sauces with SHU values ranging from 20,000 to 2,700,000 using an easy sample preparation method. To

**Simon Forster and  
Stephan Altmaier**

Merck KGaA, Direct correspondence to:  
stephan.altmaier@merckgroup.com





**Figure 1:** Structural formulas of (a) capsaicin and (b) dihydrocapsaicin. Together both molecules attribute to approximately 90% of the heat of chili peppers. Adapted from references 1 and 2.

**Table 1: Capsaicinoid content of several selected samples, 16 Scoville = 1 mg/kg capsaicinoids**

Scoville Heat Units	Example
0–10	Sweet pepper
~ 16	Human detection threshold for heat
100–500	Chili peppers
2500–5000	Tabasco sauce
2500–8000	Jalapeño peppers
30,000–50,000	Pure cayenne pepper
100,000–350,000	Habañero peppers
1,000,000	Bhut jolokia peppers
2,000,000	Standard pepper spray
5,300,000	Police pepper spray
16,000,000	Pure crystalline capsaicin

minimize sample preparation and a subsequent clogging of the column, a robust monolithic silica capillary column was used in this work. This setup also enables fast separations at low back pressure on conventional HPLC systems. A main focus of the work was to optimize the LC–MS method in a way that allows for a quick and simple separation of analytes and a subsequently easy quantification. These results were compared against the manufacturer's information where it was available.

## Experimental

### Materials and Methods

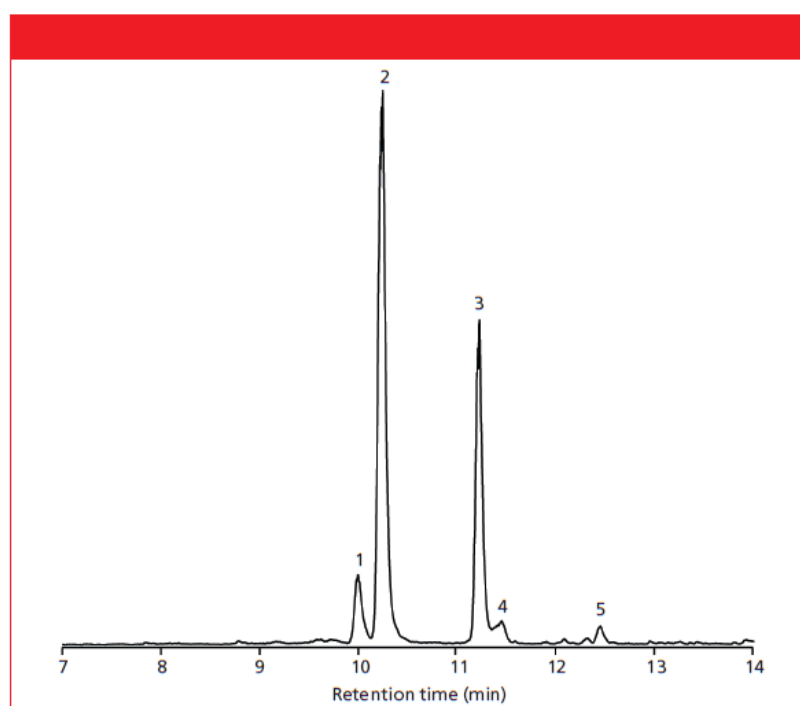
The HPLC system used was a Dionex Ultimate 3000 nano (Thermo Scientific Dionex Corporation) including Chromolith CapRod 300–0.1 mm RP-18e and Chromolith CapRod 150–0.1 mm RP-18e analytical monolithic silica capillary columns (Merck KGaA). A UV detector was operated at 254 nm and the data acquisition was performed with Chromeleon software (Thermo Scientific). All analyses were performed utilizing “full loop” injection to avoid any deviations in injection volume.

A Bruker Esquire 3000plus mass spectrometer with an ion trap and a nano-electrospray ionization (nano-ESI) source operated in positive mode was utilized with an  $m/z$  range scan from 300 to 310.

Capsaicin and dihydrocapsaicin standards were prepared from substances purchased from Sigma Aldrich. HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Merck KGaA. All water used was double deionized using a MilliQ station (Merck Millipore).

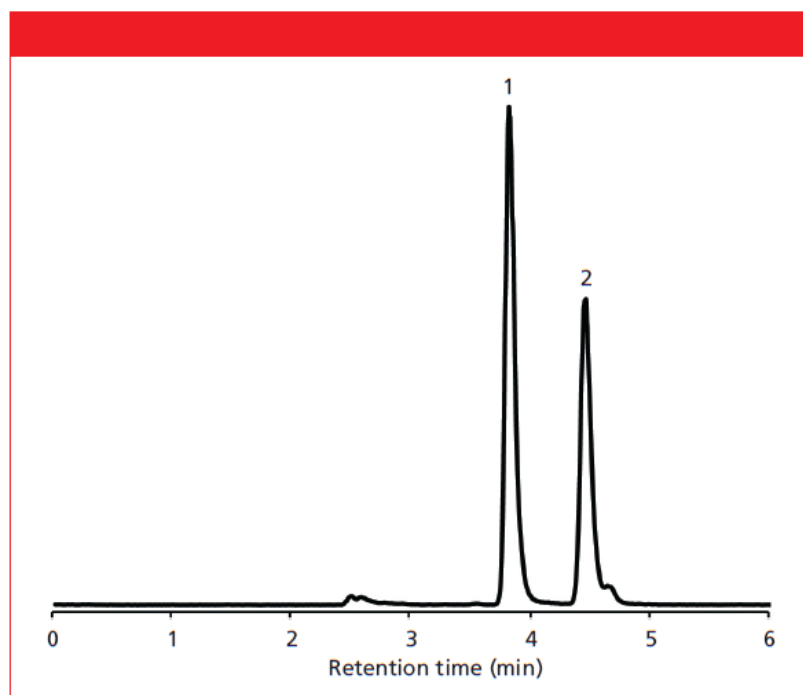
### Standard Preparation

Stock solutions were obtained by dissolving approximately 40 mg of capsaicin and

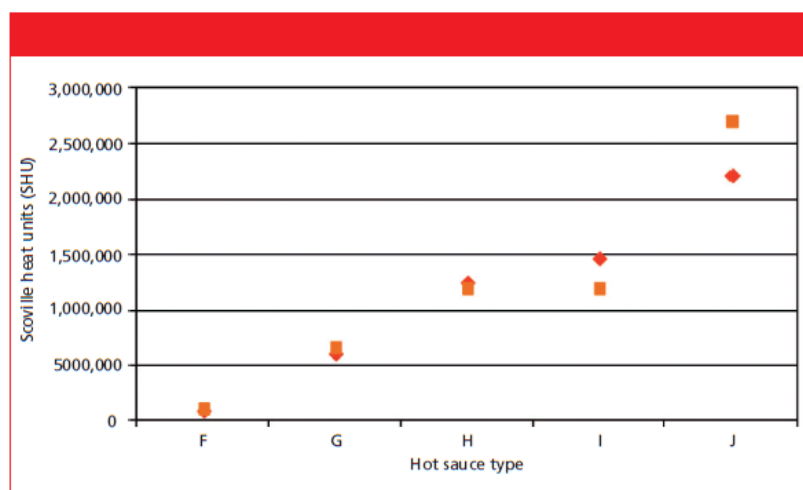


**Figure 2:** LC–MS base peak chromatogram of an extract of hot sauce A (diluted 1:100) displaying the separation of five capsaicinoids. Column: Chromolith CapRod 300–0.1 mm RP-18e; mobile-phase A: water with 0.1% formic acid; mobile-phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 35–90% B in 15 min. Peaks: 1 = nordihydrocapsaicin, 2 = capsaicin, 3 = dihydrocapsaicin, 4 = homocapsaicin, 5 = homodihydrocapsaicin.





**Figure 3:** Typical LC-MS base peak chromatogram of an extract of hot sauce B (diluted 1:1000) used for the quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. Analytes were separated on a Chromolith CapRod 150–0.1 mm RP-18e monolithic silica column in isocratic mode (acetonitrile + 0.1% formic acid–water + 0.1% formic acid 50:50 v/v).



**Figure 4:** Comparison of experimentally determined capsaicinoid content (capsaicin and dihydrocapsaicin) of hot sauces F–J (red diamonds) with manufacturer's data (orange squares). For comparison, pure capsaicin corresponds to 16 million SHU.

dihydrocapsaicin standards in 50 mL of ethanol. Subsequently, the purity of these solutions was determined via LC-MS (capsaicin: 97.5%, dihydrocapsaicin: 92.7%). For the calibration curves these solutions were diluted to 1:100–1:10,000 by using 50:50 (v/v) water–acetonitrile. All analyses were performed in the linear range of these

curves. Conversion of analyte concentration to SHUs was subsequently done by multiplying concentration (in parts per million) by a factor of 15 (4).

#### Sample Preparation

The preparation of the hot sauces was performed by Soxhlet extraction of

10–20 g of sauce for three days using ethanol or for 6 h using methanol (with comparable results). Because all samples were based on oleoresins (chili pepper extracts) and therefore free of any tomato or chili pepper chunks, no homogenization step was necessary. After extraction the supernatant solution was filtered through a 0.45- $\mu$ m syringe microfilter (Merck Millipore), made up to 100 mL with ethanol or methanol and diluted to 1:100–1:10,000 using 50:50 (v/v) water–acetonitrile. Because the analytes display high stability under the extraction conditions and assuming that extraction was quantitative (no matrix effect because of excellent comparability of different extraction method results and very good accordance of recovery rate with manufacturers data), we refrained from using an internal standard.

#### Results and Discussion

We selected a set of 10 different hot sauces with various capsaicinoid content. For half of these samples, heat was only described qualitatively using expressions such as “extremely hot,” and the other half had SHU values ranging from 111,111 to 2,700,000. Therefore, sauces were subdivided into two groups:

- no SHU data available (sauces A–F) and
- manufacturer's SHU data available (sauces G–J).

Among the five main capsaicinoids (nordihydrocapsaicin, capsaicin, dihydrocapsaicin, homocapsaicin, and homodihydrocapsaicin) present in chili peppers capsaicin and dihydrocapsaicin (see Figure 1) cause the strongest heat impression (6). In addition, they attribute to ~90% of capsaicinoid content of chili peppers (7,8).

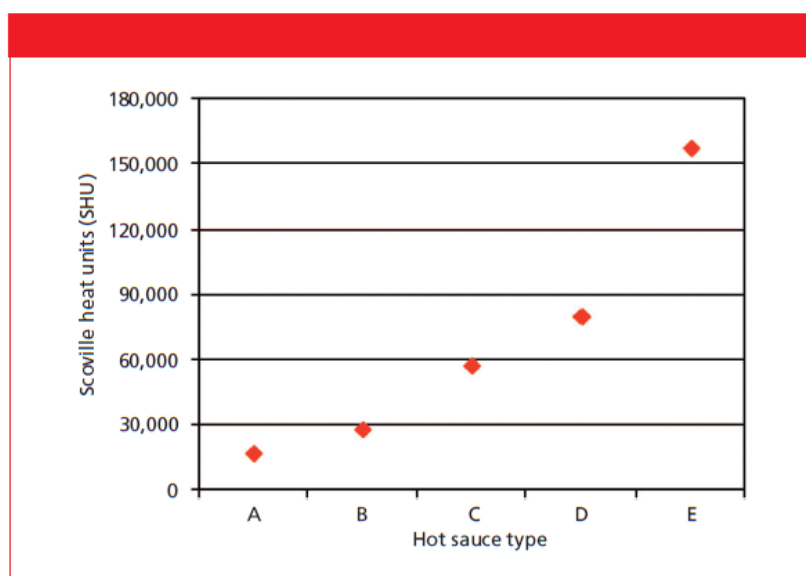
To support these findings, the hot sauce compositions were evaluated by performing gradient runs analyzing different samples (for example, see Figure 2 displaying the separation of five different capsaicinoids in sauce A).

For ease of use, the analysis of sauce heat could then be restricted to both capsaicin and dihydrocapsaicin and a fast and simple isocratic HPLC method was developed. A

**Table II: Capsaicinoid content (capsaicin and dihydrocapsaicin) of 10 analyzed hot sauce samples (experimental and manufacturer's data), 16 Scoville = 1 mg/kg capsaicinoids**

Hot Sauce Type	Scoville Heat Units (SHU) (Experimental)	Scoville Heat Units (SHU) (Manufacturer)
A	17,200	n.a.
B	28,200	n.a.
C	57,500	n.a.
D	80,100	n.a.
E	157,500	n.a.
F	91,200	111,000
G	607,000	666,000
H	1,251,000	1,200,000
I	1,470,000	1,200,000
J	2,220,000	2,700,000

n.a. = not available

**Figure 5: Comparison of experimentally determined capsaicinoid content (capsaicin and dihydrocapsaicin) of hot sauces A–E. For comparison, pure capsaicin corresponds to 16 million SHU.**

typical LC–MS chromatogram using this protocol is displayed in Figure 3. Additional multiple runs using different hot sauces showed that the method allows for a reproducible and easy quantification of the two main analytes.

A comparison of analysis and manufacturer's data reveals a very good correlation of SHU values. Because samples were produced by different sources, deviations between the two sets of figures can be explained by

methodic differences in transferring the chromatographically determined capsaicinoid content (in micrograms per milliliter) into SHU (in milligrams per kilogram) as well as in target analyte selection. Figure 4 combines the quantitative results for the determination of both capsaicin and dihydrocapsaicin in hot sauces F–J as well as manufacturer's data; in addition exact values can be found in Table II.

In Figure 5, the results for hot sauces A–F are combined. SHU

values range from 17,000 to 86,000, with an approximate mass ratio of capsaicin:dihydrocapsaicin of 1.2:1–2.4:1. This finding can be explained by the different types of chili peppers the manufacturer used for the preparation of the hot sauces.

## Conclusion

The developed method combines sample preparation with LC–MS separation and detection for a fast, easy, and reproducible determination of capsaicinoid content in various hot sauces and on conventional HPLC systems. The results revealed that the method can be applied to samples independent of capsaicinoid content with very good accuracy.

## References

- (1) S. Robinson, *Time*, June 25–July 2, 83–86 (2007).
- (2) P.W. Bosland and J.B. Baral, *HortScience* **42**, 222–224 (2007).
- (3) W.L. Scoville, *J. Am. Pharm. Assoc.* **1**, 453–454 (1912).
- (4) M.D. Collins, L. Mayer Wasmund, and P.W. Bosland, *HortScience* **30**, 137–139 (1995).
- (5) G.F. Barbero, A. Liazid, M. Palma, and C.G. Barroso, *Food Chemistry* **107**, 1276–1282 (2008).
- (6) P.H. Todd, M.G. Bensinger, and T.J. Biftu, *Food Sci.* **42**, 660 (1977).
- (7) B.V. Thomas, A.A. Schreiber, and C.P. Weisskopf, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2655–2663 (1998).
- (8) G. Reineccius, in *Source Book of Flavors, Second Edition* (Chapman and Hall, New York, 1994) pp. 267–273.

Simon Forster and Dr. Stephan Altmaier are with Merck KGaA in Darmstadt, Germany. Direct correspondence to: [stephan.altmaier@merckgroup.com](mailto:stephan.altmaier@merckgroup.com) ■

For more information on this topic,  
please visit  
[www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com)

---

## 2.5. Qualitative LC-MS analysis of pesticides using monolithic silica capillaries and potential for assay of pesticides in kidney

### Authors:

Simon Forster, Stephan Altmaier

### Institution:

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

### Bibliographic data:

LCGC Europe, LCGC Europe Sep. 2013, 488-497.

### Short summary:

A set of pesticides was spiked into human kidney matrix, re-identified and quantified using a LC-MS method. Limit of detection (LOD) was investigated on 100 µm ID monolithic silica capillary column.

### Link:

<http://www.lcgcasia.com/lcgcasia/content/printContentPopup.jsp?id=822344>

Reproduced by permission of Advanstar Communications Inc.



# Qualitative LC–MS Analysis of Pesticides Using Monolithic Silica Capillaries and Potential for Assay of Pesticides in Kidney

Simon Forster and Stephan Altmaier, Merck Millipore, Darmstadt, Germany.

This work describes a simple and sensitive high performance liquid chromatography (HPLC) method, with mass spectrometry (MS) and ultraviolet (UV) detection, for the analysis of up to 32 pesticides in a mixture. The analytes from substance classes such as carbamates, organophosphates, pyrazoles, triazines, or ureas were separated on C18 reversed-phase monolithic silica capillary columns using a gradient elution profile and directly transferred to a mass spectrometer. To improve resolution, capillaries were coupled, enabling identification of all pesticides. In addition, a porcine kidney sample was spiked with a set of seven pesticides and after a typical solid-phase extraction (SPE) procedure all analytes were detected using liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). For selected compounds, calibration curves were prepared as well as limits of detection (LODs) determined.

Since humans started to settle and grow crops, fighting pests has been an important issue to securing food supply. Approximately 4500 years ago, sulphur was used in pest control; and approximately 2500 years ago, arsenic was used for the repelling of insects (1). Until the middle of the 19th century, various inorganic chemicals were applied in pest control, including copper sulphate (smut or bunt), mercury (rats or insects), sodium chloride (weeds), or even simple water (to protect plants from caterpillars or lice [2]). Since then methods have become increasingly elegant. In the late 19th century, herbal agents, such as pyrethrum or rotenon, were discovered and used as insecticides (3,4). Over time, synthetic pesticides were developed — copper-, lead-, or mercury-containing compounds and organic molecules, such as dithiocarbamates, became the first choice of fungicides (5,6), with dinitroresol as the first synthetic insecticide. Later developments in the field of pesticide synthesis resulted in tetraethylpyrophosphate, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, esters of thiophosphoric acid, and triazines (6). In the late 1970s, traps were developed containing the pheromone of the spruce bark beetle *Ips typographus*.

According to the US Environmental Protection Agency (EPA), any substance intended for preventing, destroying, repelling, or mitigating any pest is referred to as a pesticide (7). However, pesticides differ in their properties — while molecules such as pyrethroids (for example, allethrin) or esters of thiophosphoric acid are easily biodegradable, other active agents from substance classes such as organochlorines (DDT, dieldrin), organophosphates (chlorfenvinphos, parathion), carbamates (carbetamide, carbofuran), or phenylureas (isoproturon, or linuron) are persistent and can accumulate in the environment (8).

Pesticides can be divided into three categories based on their half-lives (9):

- Nonpersistent pesticides: Half-life = <30 days; for example, pyrethroids.
- Moderately persistent: Half-life = 30–100 days; for example, many carbamates, chloroacetanilides, organophosphates, or ureas.
- Persistent pesticides: Half-life = >100 days; for example, organochlorines.

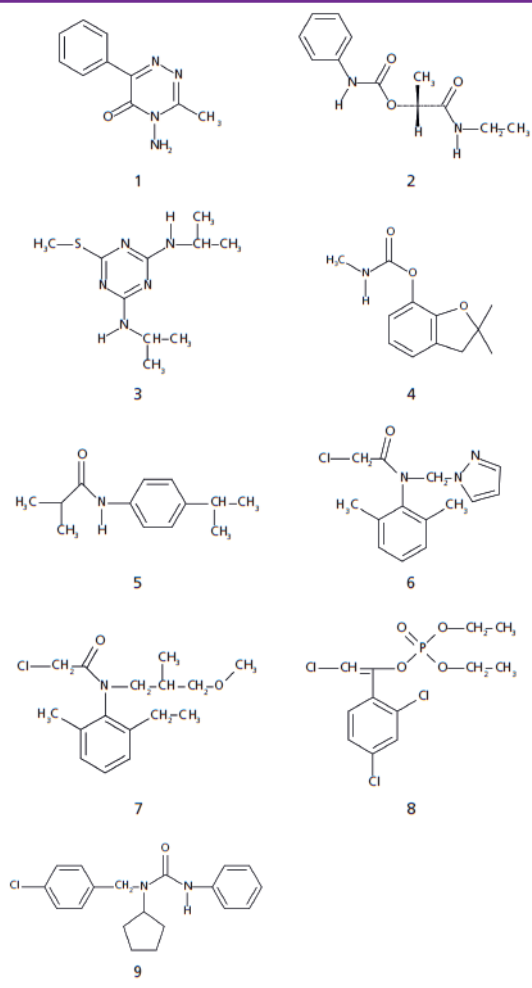
The toxicological risk of persistent compounds is high, especially with regards to accumulation in ground water resources or the food chain and the list of incidents is almost endless. In the US, atrazine and its microbial degradation products, deisopropylatrazine and deethylatrazine, were found to contribute to both surface and groundwater contamination in samples from coastal sediments, golf courses and a commercial harbour. Isoproturon and chlortoluron were found to be contaminating the Rhine as a drinking water resource. These important findings demonstrate the importance of establishing methods such as liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) (10) for fast, sensitive and accurate analysis of pesticides.

## KEY POINTS

- Complex pesticide samples can be analysed with monolithic silica capillaries. Fritless technology enables coupling with minimized dead volume and increased peak capacity.
- Monolithic silica capillaries are robust columns for high sensitivity analyses of matrix containing samples.
- LODs were determined to be in the range of 0.24–0.59 pg (0.16–0.40 ng/mL) depending on the type of pesticide.

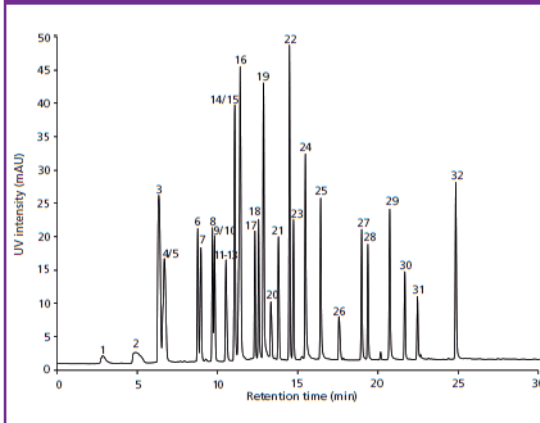


**Figure 1:** Chemical structures of pesticides from different substance classes analysed in this work. 1 = metamitron (substance class: triazinone), 2 = carbetamide (carbamate), 3 = prometryne (triazine), 4 = carbofuran (carbamate), 5 = isoproturon (phenylurea), 6 = metazachlor (chloroacetanilide), 7 = metolachlor (chloroacetanilide), 8 = chlorfenvinphos (organophosphate), 9 = pencycuron (urea).

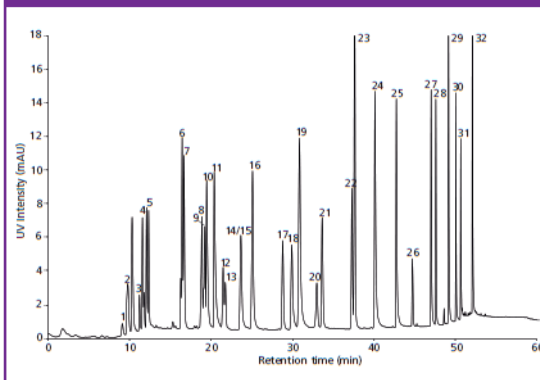


This article describes the qualitative analysis of different pesticide standard mixtures, as well as of a spiked porcine kidney sample, using monolithic silica column technology combined with liquid chromatography–ultraviolet (LC–UV) and LC–MS detection. The pesticides analysed are applied as herbicides, algacides, acaricides, insecticides, fungicides, nematocides, and rodenticides and belong to substance classes such as triazinones, carbamates, triazines, carbamates, phenylureas, chloroacetanilides, pyrazoles, chloroacetanilides, organophosphates, and ureas (see Figure 1). This list shows that the analysis of this substance class is challenging because of the different nature of the target molecules. To improve

**Figure 2:** LC–UV chromatogram displaying the separation of a mixture of 32 pesticides on a 300 mm × 0.1 mm monolithic silica capillary column. Detection wavelength: 254 nm; mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 5–85% B in 30 min. For peak annotations see Table 1.



**Figure 3:** LC–UV chromatogram displaying the separation of a mixture of 32 pesticides on two coupled 300 mm × 0.1 mm monolithic silica capillary columns. Detection: Wavelength 254 nm; mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 0' 10% B, 5' 22% B, 22' 28% B, 30' 35% B, 45' 85% B, 55' 85% B.



resolution, column coupling was performed. Limits of detection (LOD), as well as calibration curves, were determined for two of the pesticides.

## Experimental

**Materials and Methods:** The HPLC system used was a Dionex Ultimate 3000 nano (Thermo Fisher Scientific) including Chromolith CapRod RP-18 endcapped 300 mm × 0.1 mm and 150 mm × 0.1 mm analytical monolithic silica capillary columns (Merck Millipore). A UV detector was operated at 254 nm and the data acquisition was performed with Chromeleon software (Thermo Fisher Scientific). For column coupling a Teflon sleeve (IDEX) was used.

**Table 1:** Stock solution I containing 32 pesticides: Peak number, substance and substance class, activity, corresponding monoisotopic mass, and concentration.

Peak No.	Substance	Substance class	Activity	Monoisotopic mass (g/Mol)	Concentration (µg/mL)
1	Deisopropylatrazine	Triazine	Herbicide	173.0	80
2	Crimidine	Pyrimidine	Rodenticide	171.0	63
3	Metamitron	Triazinone	Herbicide	202.1	157
4	Deethylatrazine	Triazine	Herbicide	187.1	127
5	Chloridazon	Pyridazine	Herbicide	221.0	123
6	Carbetamide	Carbamate	Herbicide	236.1	485
7	Simazine	Triazine	Herbicide	201.1	244
8	Cyanazine	Triazine	Herbicide	240.1	212
9	Desethylterbutylazine	Triazine	Herbicide	201.1	161
10	Prometryne	Triazine	Herbicide	241.1	58
11	Terbutryne	Triazine	Herbicide	241.1	69
12	Karbutilate	Carbamate	Herbicide	279.2	52
13	Carbofuran	Carbamate	Acaricide, insecticide, nematocide	221.1	541
14	Methabenzthiazuron	Benzothiazole, urea	Algicide, herbicide	221.1	58
15	Atrazine	Triazine	Herbicide	215.1	57
16	Chlortoluron	Urea	Herbicide	212.1	109
17	Isoproturon	Phenylurea	Algicide, herbicide	206.1	53
18	Diuron	Phenylurea	Algicide, herbicide	232.0	47
19	Metobromuron	Phenylurea	Herbicide	258.0	99
20	Metazachlor	Chloroacetanilide, pyrazole	Herbicide	277.1	795
21	Propazine	Triazine	Herbicide	229.1	164
22	Terbutylazine	Triazine	Herbicide	229.1	189
23	Dimefuron	Oxadiazolone, phenylurea	Herbicide	338.1	81
24	Linuron	Phenylurea	Herbicide	248.0	67
25	Chloroxuron	Phenylurea	Herbicide	290.1	56
26	Metolachlor	Chloroacetanilide	Herbicide	283.1	397
27	Azinphos-ethyl	Organothiophosphate, benzotriazine	Acaricide, insecticide	345.0	162
28	Chlorfenvinphos	Organophosphate	Acaricide, insecticide	358.0	109
29	Parathion	Organothiophosphate	Insecticide	291.0	169
30	Pencycuron	Urea	Fungicide	328.1	72
31	Bifenox	Nitrophenyl ether	Herbicide	341.0	114
32	Pendimethalin	Dinitroaniline	Herbicide	281.1	95

A Bruker Esquire 3000plus mass spectrometer (Bruker Daltonics) with an ion trap and a nano-electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode was utilized with a  $m/z$  scan in the range of 170–365 (depending on the run type).

**Sample Preparation:** Stock solution I containing 32 pesticides was prepared by dissolving the compounds in acetonitrile/0.1 M formic acid (FA) and water 10:90 (v/v). This undiluted solution was utilized for UV detection, analyte concentrations are given in Table 1. For the MS analysis the stock solution was diluted by a factor of 150.

Stock solution II contained seven pesticides and was prepared by dissolving the analytes in pure acetonitrile.

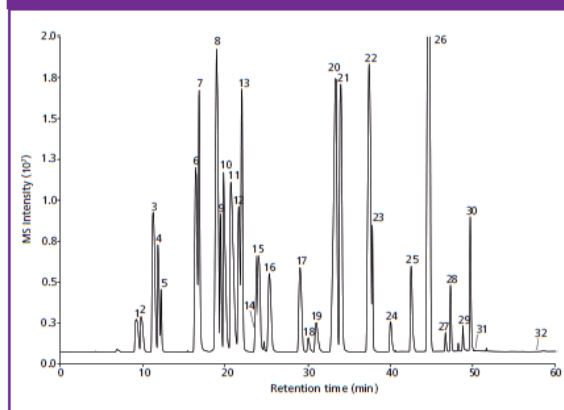
For the MS analysis this stock solution was diluted by a factor of 1000. All analyte concentrations in the stock solution are given in Table 2.

To prepare the calibration data for metamitron (MM) and metolachlor (MC) stock solution II was diluted to final concentrations of 159.0, 79.5, 31.8, 15.9, 8.0, 3.2, 1.6, 0.8, 0.3 and 0.1 µg/mL (MC); and 395.0, 197.5, 79.0, 39.5, 19.8, 7.9, 4.0, 2.0, 0.8 and 0.40 µg/mL (MM).

For the preparation of the porcine kidney samples, 1 g of kidney was homogenized utilizing a Grindomix GM 200 knife mill (Retsch). The homogenized sample was subsequently spiked with 2 mL of pesticide stock solution II. The sample was vortexed and centrifuged at 4500 rpm

**Table 2:** Peak number, substance name, and concentration of analytes in stock solution II containing seven pesticides.

Peak No.	Substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	Metamitron	159
2	Carbetamide	487
3	Prometryne	60
4	Carbofuran	548
5	Isoproturon	159
6	Metazachlor	796
7	Metolachlor	395

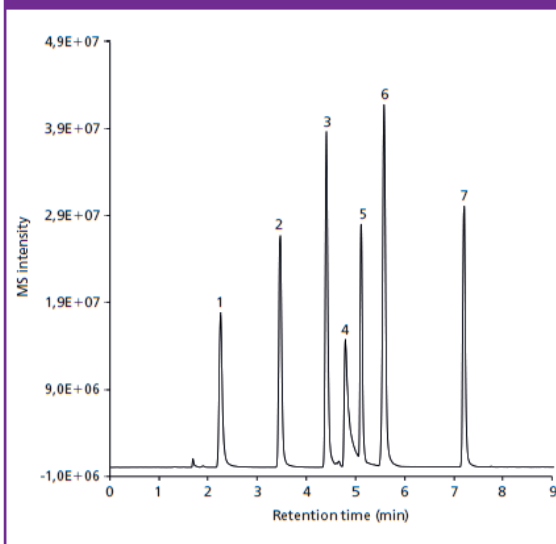
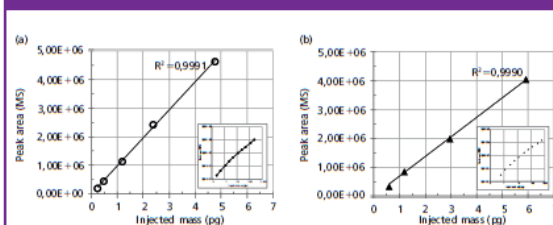
**Figure 4:** LC–MS base peak chromatogram of a mixture of 32 pesticides on two coupled 300 mm  $\times$  0.1 mm monolithic silica capillary columns ( $m/z$  = 170–365). Mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 0' 10% B, 5' 22% B, 22' 28% B, 30' 35% B, 45' 85% B, 55' 85% B.

for 20 min. The yellowish to reddish supernatant was decanted and acetonitrile removed during 120 min and at 50 °C under nitrogen stream (1 bar) using a TurboVap II (Biotage). To remove salts and tissue the residue was transferred to a LiChrolut RP-18e 500 mg cartridge (Merck Millipore) conditioned with acetonitrile and water prior to use. After a typical solid phase extraction (SPE) protocol and a final water washing step, the yellow band was eluted with 5 mL acetonitrile, followed by the addition of 2.5 mL of water to the eluate. After another concentration step (40 min, 50 °C, 1 bar nitrogen), the sample was filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter (Merck Millipore) and transferred to HPLC vials. Unspiked kidney samples were prepared in an identical manner.

## Results and Discussion

Figure 2 shows the separation of 32 pesticides on a 300 mm  $\times$  0.1 mm monolithic silica capillary column utilizing UV detection. A simple ramp allowed for the identification of most analytes within just 25 min.

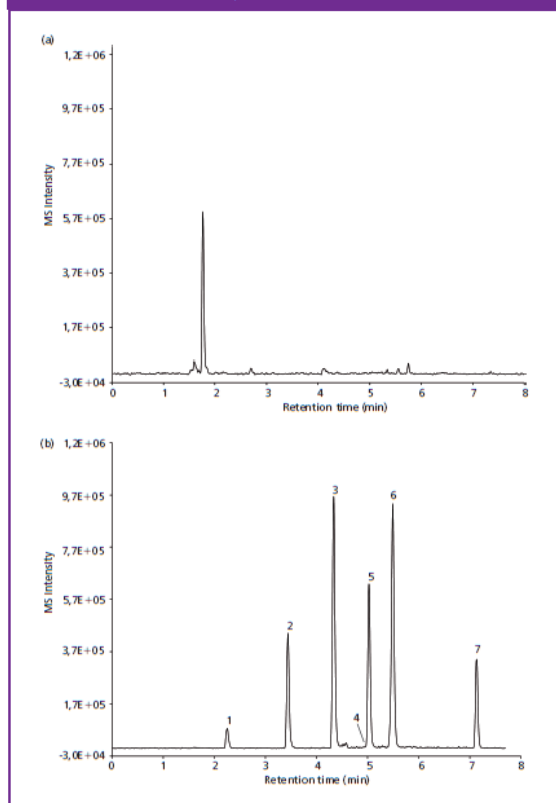
To further improve resolution column coupling was used. Coupling is quite common when handling analytical columns with internal diameters of 2 mm  $\times$  4.6 mm. However, when it comes to particle packed capillary columns that often bear frits with end fittings, coupling

**Figure 5:** Typical LC–MS base peak chromatogram of a mixture of seven pesticides on a 150 mm  $\times$  0.1 mm monolithic silica capillary column utilized for the preparation of a calibration curve and the determination of the limit of detection for both metamitron and metolachlor ( $m/z$  = 200–290). Mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 20% B to 80% B in 10 min. For peak annotations see Table 2.**Figure 6:** Calibration curves for both metamitron (open circles, a) and metolachlor (closed triangles, b). The insets show the complete concentration range while the large diagrams display the linear regions of the curves. The limits of detection for the setup are 0.24  $\mu\text{g}$  (0.16  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) for metamitron and 0.59  $\mu\text{g}$  (0.40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) for metolachlor.

adds a huge dead volume to the system and decreases the quality of a separation in terms of efficiency and resolution. In contrast, monolithic silica capillaries do not require frits or any bulky end fittings; this is the reason why coupling is quite easy. Such column coupling can be performed by means of different connector types: So-called zero dead volume unions, sometimes being a bit intricate in handling, cause minimal dead volume, or a simple solution: A Teflon sleeve with an internal diameter of 250  $\mu\text{m}$  for direct “head to tail” connection of two capillaries allows for dead volume free coupling. Because of the limited pressure stability of the latter technique it was used to connect the outlet of the analytical column to the inlet of the detector capillary, while the union with the



**Figure 7:** LC–MS base peak chromatogram of a mixture of seven pesticides spiked in porcine kidney on a 150 mm × 0.1 mm monolithic silica capillary column ( $m/z$  = 200–290). (a): Blank sample (undiluted), (b): spiked sample (diluted 1:100). Mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile with 0.1% formic acid; gradient: 20% B to 80% B in 10 min. For peak annotations see Table 2.



high pressure stability served to connect two analytical columns. Figures 3 and 4 show the results. Compared to figure 2, this setup delivers a clear improvement in terms of resolution in both UV and MS detection for at least some peak clusters (3; 4 and 5; 8; 9 and 10). Gradient profiles were optimized in both chromatographic runs as indicated in the figure captions.

Calibration curves were prepared for both metamitron (MM) and metazachlor (MC), as shown in Figure 5. Data was obtained at concentrations of 159.0 µg/mL, 79.5 µg/mL, 31.8 µg/mL, 15.9 µg/mL, 8.0 µg/mL, 3.2 µg/mL, 1.6 µg/mL, 0.8 µg/mL, 0.4 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.1 µg/mL (MM); and 395.0 µg/mL, 197.5 µg/mL, 79.0 µg/mL, 39.5 µg/mL, 19.8 µg/mL, 7.9 µg/mL, 4.0 µg/mL, 2.0 µg/mL, 0.8 µg/mL, and 0.40 µg/mL (MC). The linear range of the calibration was from 0.2–5.0 pg (0.16–3.33 ng/µL) for MM and 0.6–5.9 pg (0.40–3.93 ng/µL) for MC and the limits of detection (LOD) for the setup were 0.24 pg (0.16 ng/µL) and 0.59 pg (0.40 ng/µL) for MM and MC, respectively (see Figure 6). The column used for the linearity and LOD experiments had a length of 150 mm, while in the chromatograms separating the

32 compounds-mixture are 300 mm and 2 × 300 mm variants, that offered higher peak capacities.

The chromatograms obtained from analysing both blank and pesticide-spiked kidney samples are displayed in Figure 7. The spiked sample was diluted by a factor of 1:100 prior to injection and the chromatogram does not show any traces of matrix. For comparison, the blank kidney sample analysed without further dilution shows that some peaks that can be attributed to the matrix. When diluting the unspiked sample by a factor of 1:100 these matrix peaks disappear.

## Conclusion

Monolithic silica capillaries were used for the qualitative analysis of complex pesticide samples. It was shown that fritless capillaries can be coupled in a simple manner, minimizing dead volume for an increase in chromatographic resolution, although doubling analysis time. A calibration curve was prepared for a set of two pesticides and the linear range of this curve, as well as the LOD, was determined for both analytes. An SPE protocol was developed for the analysis of porcine kidney fortified with a pesticide standard and the extract was analysed using robust monolithic silica capillary technology. These results clearly indicate that the experimental capillary setup used in this work can be easily adapted for high sensitivity and sample restricted applications.

## References

- (1) A.E. Smith and D.M. Secoy, *J. Agric. Food Chem.* **23**(6), 1050–1055 (1975).
- (2) A.E. Smith and D.M. Secoy, *J. Agric. Food Chem.* **24**(6), 1180–1186 (1976).
- (3) B. Fugmann, F. Lieb, H. Moeschler, K. Naumann, and U. Wachendorf, *Chemie in unserer Zeit* **25**(6), 317–330 (1991).
- (4) G.T. Miller, *Living in the Environment* (Wadsworth/Thomson Learning, 12th Ed. Belmont, California, USA, 2002).
- (5) Roland Dittmeyer, Wilhelm Keim, Gerhard Kreysa, Karl Winnacker, and Leopold Kuchler, *Chemische Technik* (Band 8, Ernährung, Gesundheit, Konsumgüter. 5. Auflage. Wiley-VCH, 2004), pp. 218–223.
- (6) *Ulmans Enzyklopädie der technischen Chemie*. Bd. 18. Uran (Fortsetzung) bis Zellwolle. 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, S. 4–15 (Stichwort: Pflanzenschutzmittel, Toxikologie).
- (7) <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>
- (8) J.S. Van Dyk and B. Pletschke, *Chemosphere* **82**(3), 291–307 (2011).
- (9) E.A. Kerle, J.J. Jenkins, and P.A. Vogue, *EM 8561-E*, (Oregon State University, Oregon, USA, 1994).
- (10) L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, and B. Vieth, *Mass Spec. Rev.* **25**(6), 838–865 (2006).

**Simon Forster** is a PhD student in the Analytical Chromatography section of Merck Millipore, Darmstadt, Germany. Under the supervision of H. Kolmar (Technical University Darmstadt) and S. Altmaier, he focuses on the synthesis and development of monolithic and open tubular capillaries for liquid chromatography.

**Stephan Altmaier** received his PhD in inorganic chemistry from Hannover University (Hannover, Germany) in 2003. Today, he is a laboratory manager in the Analytical Chromatography section of Merck Millipore. His focus is on the development of applications on monolithic silica HPLC columns of various dimensions and selectivities using UV and MS detection.



---

## 2.6. Wie scharf ist “hot”? Analyse des Capsaicin-Gehalts in Chilisoßen

### Authors:

Simon Forster, Stephan Altmaier

### Institution:

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany

### Bibliographic data:

labor&more, ChromChat, 2012, 4, 64-68.

### Kurzzusammenfassung:

Applikationsbeispiel zur Verwendung monolithischer Silica-Kapillaren (CapRod) in der Lebensmittelanalytik: Isolierung und Quantifizierung von Capsaicin aus scharfen Saucen sowie Entwicklung einer LC-MS-Methode. Populärwissenschaftliche Hintergrundinformationen zur Historie der Schärfegradbestimmung.

### Link:

<http://www.laborundmore.de/archive/582272/Analyse-des-Capsaicin-Gehalts-in-Chilisossen.html>

Dieser Artikel ist frei zugänglich (open access).

# ChromChat

## Wie scharf ist „hot“?



Foto: istockphoto.com | Andrey Marjuk

Analyse des Capsaicin-Gehalts in Chilisoßen

Simon Forster, Dr. Stephan Altmaier,  
Merck KGaA, Darmstadt

**Ob der Genuss einer scharfen Currywurst ein angenehmes Prickeln auf der Zunge oder Tränen in den Augen hinterlässt, entscheidet die Dosis an Capsaicin. Der Naturstoff ist in Chili- und Paprikaschoten enthalten und wird auch als Wirkstoff in Rheumapflastern oder Pfeffersprays eingesetzt. Zwei Merck-Forscher haben den Schärfeegrad ihres Mittagsimbisses im Labor mit modernster HPLC-Technik analysiert.**

### Von wegen Fast Food!

Wer eine Currywurst bei der Darmstädter Filiale einer im Rhein-Main-Gebiet ansässigen Imbisskette verzehren möchte, sollte etwas Zeit mitbringen. Der Genuss beginnt bereits bei der individuellen Auswahl der Zutaten. Hat der Hungerige die Entscheidung für die gewünschte Basis – eine Thüringer-Bratwurst oder eine Rindswurst – gefällt, kann er den 80 Grad warmen Ketchup mit sieben verschiedenen Geschmacksrichtungen verfeinern lassen. Neben klassischem Curry reicht das Angebot von Koriander und Zimt über Lemon-Curry bis hin zu einer Gewürzmischung aus 17 Komponenten mit dem klangvollen Namen Jambalaya. Die letzte kleine Entscheidung ist gleichzeitig die wichtigste: Wie scharf darf die Currywurst sein? Sechs Schärfegrade, von A bis F, stehen zur Wahl. „Ein Großteil unserer Kunden entscheidet sich für eine A- oder B-Wurst, die wir mit EU-Chilipulver würzen. Ab Schärfegrad C kommen unsere ‚Hot Sauces‘ zum Einsatz. Diese Würste verkaufen wir erst an Kunden ab 18 Jahren. Der Verzehr erfolgt auf eigenes Risiko“, berät Simon Lauth, Geschäftsführer der Darmstädter Imbissfiliale, seine Kunden.

### Heiße Soßen und scharfe Schoten

Nicht von ungefähr werden scharfe Soßen als „hot“ oder „feurig“ bezeichnet. Denn Schärfe ist kein Geschmack, sondern eine Schmerzempfindung, die über Hitzerezeptoren im Mund ausgelöst wird. Verursacht wird der Schmerz z.B. durch Capsaicin, einen Naturstoff, der vor allem in den Samenscheidewänden und der Plazenta von Chilischoten enthalten ist.

Das Alkaloid Capsaicin bewirkt im Gegensatz zu den scharfen Inhaltsstoffen, die in schwarzem Pfeffer (Piperin) oder Wasabi (Isothiocyanate) enthalten sind, eine deutlich länger anhaltende Desensibilisierung der Nerven, die für die Weiterleitung des Wärmereizes verantwortlich sind. Deshalb tragen regelmäßige Chilikonsumenten schärfere Speisen als gelegentliche Scharfesser oder Untrainierte. Die unterschiedliche Wirkung verschiedener Scharfstoffe bestätigt auch Chiliexperte Simon Lauth: „Schon mancher unserer indischen Gäste, der den Genuss von scharfem Wasabi oder Ingwer gewohnt ist, hat sich bei der Wahl des Schärfegrades überschätzt und konnte seine Currywurst nicht verzehren.“ Mit Oli-

venöl, Mayonnaise oder Kakao lasse sich der Schmerz lindern, rät Lauth den Currywurstessern in diesen Fällen. Denn die Scharfstoffe im Chili lösen sich gut in Fett. Auch das Kauen von Brot schafft Abhilfe, denn der dabei entstehende Speichel löst das Capsaicin aus den Rezeptoren.

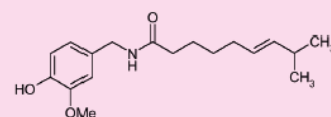
#### Capsaicin – scharf und gesund

Capsaicin ist ein Alkaloid, das aus Pflanzen der Gattung Capsicum gewonnen wird. Hierzu zählen Chilifrüchte wie Habanero, Cayenne, Jalapeno oder Paprika. Chili wird bereits seit über 6000 Jahren kultiviert und traditionell vor allem in der mexikanischen Küche eingesetzt. Gemahlene Chilis werden als Cayennepfeffer bezeichnet. Als Grundlage dafür dienen meist die getrockneten, scharfen Früchte der Chilisorte Cayenne.

Reines Capsaicin ist farblos, kann durch Kochen nicht zersetzt werden und löst sich in Fett oder Alkohol. Es regt den Appetit an und bringt den Kreislauf in Schwung. Die gesteigerte Speichel- und Magensaftproduktion wirkt dabei antibakteriell.

Bei Säugetieren bewirkt der Verzehr von Capsaicin, z. B. aus Paprika- oder Chilischoten, einen Hitzereiz, der als Schmerz bzw. Schärfe empfunden wird.

Doch Capsaicin kann nicht nur Schmerz auslösen, sondern ihn auch lindern. Es dient als durchblutungsfördernder Wirkstoff in Rheumasalben, Wärmepflastern oder Salben zur Behandlung von Nervenschmerzen. Auch eine blutdrucksenkende Wirkung des Capsaicins wurde nachgewiesen. Weitere Anwendungen des Alkaloids sind Pfeffersprays und der Einsatz als Fungizid.



**Capsaicin ist das Vanillylamid der Fettsäure trans-8-Methyl-6-nonen-säure**

# ChromChat



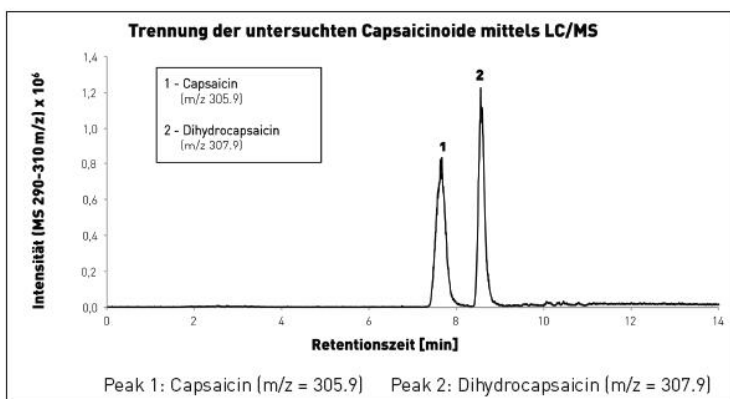
Foto: © Stephan Altmair



**Simon Forster (links) und Dr. Stephan Altmair (rechts) verbindet die gemeinsame Leidenschaft für extrem scharfe Currywürste.**

**Simon Forster** studierte Chemie an der TU Darmstadt und fertigte seine Diplomarbeit über potenzialgesteuerte Chromatografie bei der Tosoh Bioscience GmbH in Stuttgart an. Heute arbeitet er als Doktorand in der analytischen Chromatografie der Merck KGaA im Labor von Dr. Stephan Altmair. Unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Kolmar, TU Darmstadt beschäftigt er sich mit der Synthese und der Entwicklung monolithischer Kapillarsäulen für die Flüssigchromatografie.

**Stephan Altmair** studierte Chemie an der LMU München und promovierte 2003 in Hannover im Bereich analytische Festkörperchemie über geordnete, mesoporöse Silicastrukturen. Die folgenden beiden Jahre arbeitete er an der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe Hannover und war für die Forschung an metallischen Nanopartikeln zur Grundwasser- und Bodensanierung verantwortlich. Im Jahr 2006 wechselte er zur Merck KGaA, wo er als Postdoc im Bereich der analytischen Chromatografie an der Entwicklung monolithischer HPLC-Säulen arbeitete. Seit 2008 ist er dort als Laborleiter tätig. Sein Forschungsschwerpunkt sind monolithische Chromatographiesäulen mit unterschiedlichen Dimensionen und Selektivitäten.



**Abb. 1: Chromatografische Trennung und Quantifizierung von Capsaicin und Dihydrocapsaicin**  
Monolithische Kapillarchromatographiesäule Chromolith<sup>®</sup> CapRod<sup>®</sup>, 150-0.1 mm RP-18e (reversed phase), HPLC: Dionex Ultimate 3000 nano, ESI-MS: Bruker Esquire 3000plus

## Die Scoville-Skala – Schärfemessung mit Tradition

Besonders sorgfältig dosiert Lauth die Hot Sauce bei einer Currywurst des Schärfegrades F. Nur einen Tropfen gibt er auf jedes Wurststück, bevor er dieses mit warmem Ketchup bedeckt. Denn damit die Currywurst schmeckt und nicht zur Atemnot oder gar Ohnmacht führt, muss die Dosierung der Chilisoße stimmen.

Wie scharf ein Lebensmittel oder eine Soße ist, wird mit der Scoville-Skala festgelegt. Sie wurde nach Wilbur L. Scoville benannt, der im Jahr 1912 das erste Messverfahren für Schärfe entwickelte. Als Messinstrument diente dem Chemiker des Detroit Pharmaunternehmens Parke, Davis & Co. die menschliche Zunge: Er ließ seine Probanden eine immer weiter verdünnte

### Analytische Bedingungen

#### Capsaicin/Dihydrocapsaicin-Standardlösungen für die Kalibrierung

Kalibrierlösungen aus den Reinstsubstanzen (Fa. Sigma Aldrich) in 100% Methanol hergestellt

Bestimmung des linearen Bereichs der Kalibrierung --> Verdünnung 1:1.000 und 1:50.000 mit 70:30 Wasser:Acetonitril (v/v)

Reinheitsbestimmung durch Flächenprozentanalyse LC/MS

Validierung durch Aufstockungsexperiment

#### Probenvorbereitung

Extraktion der Hot Sauce unter Rühren in siedendem Methanol (6 h)

Mikrofiltration (0,45 µm, Spritzenfilter Fa. Whatman)  
--> Verdünnung 1:1.000–1:100.000 mit 70:30 Wasser:Acetonitril (v/v)  
(für linearen Bereich der Kalibrierung)

#### HPLC (Dionex Ultimate 3000 nano)

Kapillarsäule: CapRod 150-0.1 mm RP18e

Mobile Phase A: Wasser + 0,1% Ameisensäure

Mobile Phase B: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure

Gradient B: 30% auf 50% in 4 min, 50% auf 95% in 0,2 min, 10 min bei 95%

Flussrate: 2,0 µL/min

Druck: 90 bar

Injektionsvolumen: 100 nL

Temperatur: 25 °C

#### MS (Bruker Esquire 3000plus)

Analysator: Ionenfalle

Quelle: Electrospray Ionisation (ESI), pos. mode

Detektionsparameter:  $m/z$  range scan: 300–310  $m/z$ , 13.000  $m/z/s$

[Quellenparameter: 10 psi Nebulizer, 5,0 L/min Trocknungsgas, 250 °C]



Lösung einer Probe kosten, bis diese kein Brennen mehr spürten. Über den Verdünnungsgrad ergab sich der Grad der Schärfe. Brauchte es beispielsweise 10.000 Tropfen Wasser, bis die Schärfe von 1 Tropfen Chili- soße nicht mehr wahrgenommen wurde, betrug die Schärfe 10.000 Scoville-Einheiten (Scoville Heat Unit, kurz SHU).

Noch heute findet die Scoville-Skala Anwendung. Scovilles Messverfahren – das nicht nur schmerzhaft war, sondern auch zu nicht reproduzierbaren Messergebnissen führte, weil sich ein Proband schon nach kurzer Zeit an die Schärfe gewöhnte – wurde jedoch durch moderne technische Messverfahren ersetzt. Der Schärfegrad wird heute mit Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) gemessen. Dabei werden neben Capsaicin bis zu neun weitere Capsaicinoide quantitativ bestimmt, die die Schärfe einer Capsicum-Frucht ausmachen.

Reines Capsaicin hat eine Schärfe von 16.000.000 SHU. Als kristalline Reinsubstanz darf es gemäß einer EU-Verordnung in keiner Form Lebensmitteln zugesetzt werden. Labormitarbeiter sollten beim Umgang damit Handschuhe und Atemmaske tragen. Der Zusatz von Capsaicin als Extrakt der Chilischoten ist jedoch unbegrenzt erlaubt. In der Aromenindustrie werden gewöhnlich Chiliextrakte mit einem natürlichen Capsaicin-Gehalt von ca. 7% (über 1.000.000 SHU) eingesetzt.

### Echt scharf?!

Die Herstellerangaben für die vier Hot Sauces der Darmstädter Imbissfiliale reichen von

111.000 Scoville (Schärfe C) bis hin zu 1.200.000 Scoville für die Schärfe F. Für gut Trainierte hält Simon Lauth in Darmstadt noch eine Triple-F-Sauce mit 2.700.000 Scoville unter der Ladentheke bereit. Diese Werte beziehen sich auf die puren Soßen. „Verdünnt“ man rund ein Dutzend Tropfen dieser Hot Sauces mit einer Wurst, Ketchup und leckerem Brot, bleibt dennoch ein extrem scharfer Imbiss, der nur von wenigen trainierten Scharfessern verzehrt werden kann.

Nach einigen Selbstversuchen in der Mittagspause mit Currywürsten der Kategorien A und B beschlossen die HPLC-Experten Dr. Stephan Altmaier und Simon Forster, die Tests der noch schärferen Hot Sauces in das eigene Labor zu verlegen, um dort die Herstellerangaben mit modernster Analytik zu überprüfen.

Dazu wurden Proben der Soßen C bis Triple F mit Methanol extrahiert und mit HPLC und Massenspektrometrie (MS) untersucht. Die Kopplung ermöglicht eine exakte Identifizierung und quantitative Bestimmung von Substanzgemischen. Die Analyse beschränkt sich auf die Substanzen Capsaicin und Dihydrocapsaicin (Abb. 1). Beide Verbindungen haben im Reinzustand eine Schärfe von 16.000.000 Scoville und unterscheiden sich in ihrer Struktur nur durch eine Doppelbindung. Zusammen machen sie über 90% der Chilischärfe aus.

Zur Kalibrierung wurden zunächst die beiden Reinsubstanzen vermessen und die erhaltenen Massenkonzentrationen (ppm) in die Scoville-Skala überführt. Abbildung 2 zeigt die durch mehrfache Messungen validierten Ergebnisse der Analyse für fünf

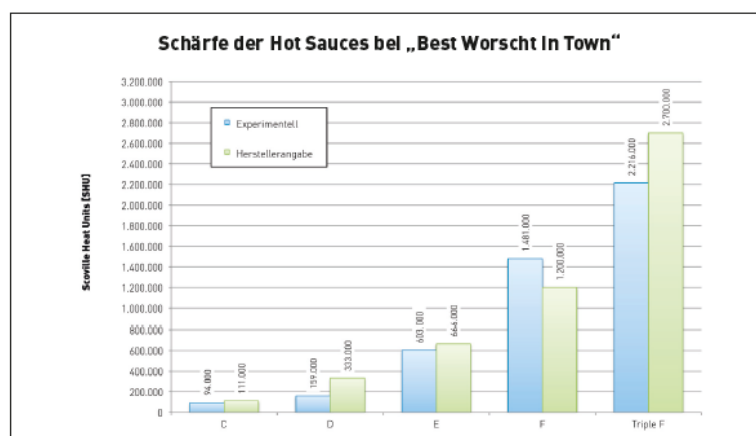


Abb. 2 Vergleich der HPLC-Schärfemessung mit den Herstellerangaben

# ChromChat

Hot Sauces im Vergleich mit den Herstellerangaben.

Abweichungen der Messergebnisse zu den Scoville-Angaben auf den Etiketten der Hot Sauces können zum Einen auf eine Varianz des Gehalts an Capsaicinoiden in natürlichen Chiliextrakten zurückzuführen sein. Viele Faktoren wie Licht, Wasser, Boden und Erntezeitpunkt entscheiden über den Anteil an Capsaicin in einer Chilischote. Selbst gleichzeitig und von derselben Pflanze geerntete Chilifrüchte können unterschiedliche Schärfegrade aufweisen. Darüber hinaus wurden bei der Analyse nur zwei von neun Capsaicinoiden quantitativ bestimmt, auch dies kann zu Abweichungen führen.

Dennoch, die Analysen im Merck-Labor belegen: Hot Sauces der Imbisskette tragen ihren Namen zu Recht.

Etwas fünfmal am Tag reicht Simon Lauth eine F-Wurst über die Imbissstheke. Nach anfänglichen Schmerzen beim Verzehr

stellt sich dabei bei geübten Scharfesemern schon bald eine leichte Euphorie ein, teilweise begleitet von einem unvermittelten Schmunzeln. Grund dafür ist die Ausschüttung von Glückshormonen (Endorphinen), mit denen der Körper den Capsaicin-Schmerz zu bekämpfen versucht. Chilixperte Lauth bezeichnet diesen Zustand als „Pepper-High“.

Mit diesem Wissen haben die Autoren ihren empirischen Selbstversuch inzwischen auf Currywürste der Kategorien C–F ausgeweitet; die Triple-F-Soße wird allerdings wohl unter der Ladentheke bleiben.

→ [stephan.altmaler@merckgroup.com](mailto:stephan.altmaler@merckgroup.com)

Literatur bei den Autoren

## Hauchdünn und schnell – die HPLC-Trennsäule Chromolith® CapRod®

Chromolith®-HPLC-Säulen sind nicht mit kleinen Partikeln gepackt, sondern bestehen aus einem einzelnen Stück hochreinen Silicagels. Ihre hoch poröse, monolithische Struktur ermöglicht Trennungen in einem Bruchteil der Zeit im Vergleich zu einer partikelgefüllten Standardsäule. Eine längere Lebensdauer und geringere Matrixempfindlichkeit bei biologischen Proben sind weitere Vorzüge der Chromolith®-Säulen.

Chromolith® CapRod® ist eine Kapillarsäule (Innendurchmesser 100 µm), die die Geschwindigkeit einer monolithischen Säule mit der Empfindlichkeit der Nano-LC vereint. Sie wurde für die effiziente und selektive Trennung in der Proteomforschung konzipiert.

Die Trennsäule kann bei vergleichsweise hohen Flussraten ohne Leistungsverlust betrieben werden. Trennungen werden bereits bei 1–3 µL/min erreicht – im Vergleich zu 200–400 nL/min bei Mikropartikelsäulen.

[www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)



Bhut Jolokia



Scotch Bonnet



Chiltepin



Chinle



Pasilla



NuMex Las Cruces

Scoville-Einheiten		Schärfe Grad	Hot?
16.000.000	reines Capsaicin und Dihydrocapsaicin	10+	Gnadentos scharf
5.300.000	Polizei-Pfefferspray		
mehr als 500.000	Bhut Jolokia, Naga, Bih Jolokia, Jolokia, Naga Morich, Trinidad Scorpion	10	Gnadentos scharf
100.000 – 500.000	Habanero, Scotch Bonnet, Caribbean Red, Red Savina, Hot Paper Lantern, Fatalii, Afrikanische Birdseye	10	
50.000 – 100.000	Chiltepin, Santaka, Rocoto, Malaguetta, Lugalah	9	
30.000 – 50.000	Thai, Piquin, lange Cayenne-Schoten, scharfe kalabrische Peperoncini („Diavolini“)	8	Sehr scharf
15.000 – 30.000	Chile de Arbol, Hot Jalapeño, NuMex Barker, Hot Lemon	7	
5.000 – 15.000	Frühe Jalapeño, Aji Amarillo, Serrano, Chipotle, Las Cruces Cayenne	6	
2.500 – 5.000	TAM Mild Jalapeño, Mirasol, diverse große dicke Cayenne-Schoten Tabascosauce	5	schon schärfer
1.500 – 2.500	Pimenton de la Vera, (hot), Sandia, Cascabel, Yellow Wax Hot, Kashmir, Piment d'Espelette	4	
1.000 – 1500	Ancho, Pasilla, Española Improved, Jalapeño NuMex Primavera	3	Mild bis mittel
100 – 500	NuMex Big Jim, NuMex 6-4, Piquillo	2	
16	durchschnittliche Wahrnehmungsgrenze für Schärfe		
10 – 100	NuMex RNaky, Mexi-Bell, Cherry mild; grüne Chilis in der Dose, scharfe ungarische Paprika, Pimenton de la Vera, (duke, mild)	1	
0	Gemüsepaprika, Pimiento, Sweet Banana Chilis	0	unscharf

Quelle: [www.pepperworld.com](http://www.pepperworld.com)

Chili-Fotos: Panthermedia, Kaisersoft, pepperworld

---

### 3. Ausblick

---

Die im allgemeinen Teil vorgestellten, grundsätzlichen Überlegungen zur Miniaturisierung von chromatographischen Trennstrecken gelten im Besonderen für die Entwicklung von open tubular-Kapillaren, welche als das ultimative Ziel hinsichtlich Säulenminiaturisierung betrachtet werden. Aktuelle Trends in Richtung Ultrahochdruck-LC (UHPLC) im Zusammenspiel mit der heutigen Verfügbarkeit geeigneter mikro- und nano-Instrumente bieten ein hervorragendes Potential zur weiteren Entwicklung sehr langer, am Material-determinierten Drucklimit betriebener, miniaturisierter Kapillaren mit potentiell extrem hoher Auflösung bzw. Peakkapazität. Relevante Applikationen aus dem Pharma- und medizinischen Sektor, welche den Einsatz eines solchen Trennmediums nicht nur optional, sondern unabdingbar machen, könnten in den kommenden Jahren Einfluss auf den Fortschritt dieser Entwicklung nehmen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine große Diskrepanz zwischen der akademischen Methodenvielfalt auf diesem Gebiet und der tatsächlichen Präsenz miniaturisierter LC-Systeme auf dem Markt vorhanden. Dies ist vor allem in der Tatsache begründet, dass Methodentransfers von validierten und robusten 4,6 mm-Säulen nur mit hohem Aufwand erfolgen können und es in den meisten Fällen (aufgrund ebenfalls fortschreitender Entwicklung im Partikelbereich, siehe sub-2-micron und core-shell) auch keine Notwendigkeit dafür gibt. Erst für probenlimitierte Applikationen ist die Verwendung eines miniaturisierten Systems, nicht zuletzt aus Kostengründen, wirklich sinnvoll. Eine Beurteilung der Kosten hinsichtlich einer möglichen Produktentwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten open tubular-Kapillaren muss den erhöhten Arbeitseinsatz einer *in situ*-Synthese berücksichtigen, sodass die stationäre Phase nicht batch-weise (außerhalb der Kapillare) hergestellt werden kann. Ein solches Verfahren reduziert automatisch die Reproduzierbarkeit aufgrund einer Vielzahl von Einflussfaktoren, nicht zuletzt des Mitarbeiters selbst. Der Kostenfaktor Rohstoffe kann aus Herstellersicht vernachlässigt werden; die eingesetzten, unbehandelten fused silica-Kapillaren jedoch sind zu berücksichtigen: Der Preis pro Meter beträgt im kleinen Maßstab ca. 5-10 Euro, bei einer Säulenlänge von z.B. 5 Metern und einer verfahrensbedingten Ausschussquote von 50 % ergeben sich pro Säule immerhin schon 50-100 Euro an Materialkosten. Da es sich bei dem in dieser Dissertation entwickelten Verfahren jedoch um eine akademische Grundlagenarbeit handelt, wurde nur geringer Aufwand zur Effizienzsteigerung des Prozesses betrieben. Alle Kapillaren wurden als Einzelstück gefertigt, für einen Produktionsübertragungsprozess wäre die Entwicklung einer Parallelsynthese zu empfehlen. Der Kapillardurchmesser von 10  $\mu\text{m}$  scheint ein optimaler Kompromiss aus Machbarkeit und Trenneffizienz unter Anwendung des Sol-Gel-Verfahrens zu sein. Mit einer noch weiter fortschreitenden Miniaturisierung ( $< 5 \mu\text{m}$  ID) wäre eine Verschlechterung von Retentionseigenschaften und Beladungskapazität verbunden, wenn auch eine noch höhere Trennleistung in Aussicht steht. Ein mögliches Anwendungsgebiet in der Zukunft könnte die Entwicklung von beschichteten, dadurch porösen chip-Templaten sein. Die hier präsentierte Methode zur Beschichtung von Kapillarinnenwänden ist grundsätzlich auf jede Form miniaturisierter ( $\text{SiO}_2$ -)Geometrie anwendbar.





---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] J.H.Knox, J. Chrom. Sci 18 (1980) 453.
- [2] G.Desmet, S.Eeltink, Anal. Chem. 85 (2013) 543.
- [3] J.Vissers, J. Chrom. A 856 (1999) 117.
- [4] Y.Shen, R.Zhao, S.J.Berger, G.A.Anderson, N.Rodriguez, R.D.Smith, Anal. Chem. 74 (2002) 4249.
- [5] S.Bruns, J.P.Griniias, L.E.Blue, J.W.Jorgenson, U.Tallarek, Anal. Chem. 84 (2012) 4496.
- [6] J.H.Knox, J.F.Parcher, Anal. Chem. 41 (1969) 1599.
- [7] R.T.Kennedy, J.W.Jorgenson, Anal. Chem. 61 (1989) 1128.
- [8] K.D.Patel, A.D.Jerkovich, J.C.Link, J.W.Jorgenson, Anal. Chem. 76 (2004) 5777.
- [9] H.Minakuchi, K.Nakanishi, N.Soga, N.Ishizuka, N.Tanaka, Anal. Chem. 68 (1996) 3498.
- [10] K.Cabrera, D.Lubda, H.-M.Eggenweiler, H.Minakuchi, K.Nakanishi, J. High Res. Chromatogr. 23 (2000) 93.
- [11] S.Altmaier, K.Cabrera, J. Sep. Sci 31 (2008) 2551.
- [12] T.Hara, H.Kobayashi, T.Ikegami, K.Nakanishi, N.Tanaka, Anal. Chem. 78 (2006) 7632.
- [13] D.Hlushkou, S.Bruns, A.Höltzel, U.Tallarek, Anal. Chem. 82 (2012) 7150.
- [14] O.Núñez, K.Nakanishi, N.Tanaka, J. Chrom. A 1191 (2008) 231.
- [15] K.Miyamoto, T.Hara, H.Kobayashi, H.Morisaka, D.Tokuda, K.Horie, K.Koduki, S.Makino, O.Nunez, C.Yang, T.Kawabe, T.Ikegami, H.Takubo, Y.Ishihama, N.Tanaka, Anal. Chem. 80 (2008) 8741.
- [16] H.Eghbali, K.Sandra, F.Detobel, F.Lynen, K.Nakanishi, P.Sandra, G.Desmet, J. Chrom. A 1218 (2011) 3360.
- [17] F.Svec, J.M.J.Fréchet, Anal. Chem. 64 (1992) 820.
- [18] F.Svec, J. Chrom. A 1217 (2010) 902.
- [19] L.Xiong, R.Zhang, F.E.Regnier, J. Chrom. A 1030 (2004) 187.
- [20] S.Eeltink, L.Geiser, F.Svec, J.M.J.Fréchet, J. Sep. Sci 30 (2007) 2814.
- [21] J.P.Kutter, J. Chrom. A 1221 (2012) 72.
- [22] H.Yin, K.Killeen, J. Sep. Sci 30 (2007) 1427.
- [23] S.Jung, U.Effelsberg, U.Tallarek, Anal. Chem. 83 (2011) 9167.
- [24] S.Ehlert, L.Trojer, M.Vollmer, T.van de Goor, U.Tallarek, J. Mass. Spectrom. 45 (2010) 313.
- [25] W.De Malsche, S.De Bruyne, J.Op De Beek, P.Sandra, H.Gardeniers, G.Desmet, F.Lynen, J. Chrom. A 1230 (2012) 41.
- [26] W.De Malsche, J.Op De Beek, S.De Bruyne, H.Gardeniers, G.Desmet, Anal. Chem. 84 (2012) 1214.
- [27] S.Sukas, W.De Malsche, G.Desmet, H.Gardeniers, Anal. Chem. 84 (2012) 9996.
- [28] J.Op De Beek, W.De Malsche, P.de Moor, G.Desmet, J. Sep. Sci 35 (2012) 1877.
- [29] W.De Malsche, H.Eghbali, D.Clicq, J.Vangeloooven, H.Gardeniers, G.Desmet, Anal. Chem. 79 (2007) 5915.
- [30] P.Gzil, J.De Smet, N.Vervoort, H.Verelst, G.V.Baron, G.Desmet, J. Chrom. A 1030 (2004) 53.
- [31] P.Q.Tranchida, L.Mondello, J. Chrom. A 1261 (2012) 23.
- [32] J.Billen, G.Desmet, J. Chrom. A 1168 (2007) 73.
- [33] K.Hibi, D.Ishii, I.Fujishima, T.Takeuchi, T.Nakanishi, J. High Res. Chrom. & Chrom. Comm. 1 (1978) 21.

- 
- [34] J.H.Knox, M.T.Gilbert, *J. Chrom.* 186 (1979) 405.
- [35] G.Guiochon, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1318.
- [36] T.Tsuda, K.Hibi, T.Nakanishi, T.Takeuchi, D.Ishii, *J. Chrom.* 158 (1978) 227.
- [37] D.Ishii, T.Tsuda, K.Hibi, T.Takeuchi, T.Nakanishi, *J. High Res. Chrom. & Chrom. Comm.* 2 (1979) 371.
- [38] D.Ishii, T.Takeuchi, *J. Chrom. Sci* 18 (1980) 462.
- [39] J.W.Jorgenson, E.J.Guthrie, R.L.St Claire III, P.R.Dluzneski, L.A.Knecht, *J. Pharm. & Biom. Anal.* 2 (1984) 191.
- [40] J.Jorgenson, E.J.Guthrie, *J. Chrom.* 255 (1983) 335.
- [41] F.Yang, *J. HRC & CC* 3 (1980) 589.
- [42] F.Yang, F., *J. Chrom. Sci* 20 (1982) 241.
- [43] P.P.H.Tock, P.P.E.Duijsters, J.C.Kraak, H.Poppe, *J. Chrom.* 506 (1990) 185.
- [44] R.P.W.Scott, *J. Chrom.* 517 (1990) 297.
- [45] T.J.Causon, R.A.Shellie, E.F.Hilder, G.Desmet, S.Eeltink, *J. Chrom. A* 1218 (2011) 8388.
- [46] F.Yang, *J. High Res. Chrom. & Chrom. Comm.* 3 (1980) 589.
- [47] R.Swart, J.C.Kraak, H.Poppe, *Trends. Anal. Chem.* 16 (1997) 332.
- [48] P.P.H.Tock, G.Stegeman, R.Peerboom, H.Poppe, J.C.Kraak, K.K.Unger, *Chromatographia* 24 (1987) 617.
- [49] P.P.H.Tock, C.Boshoven, H.Poppe, J.C.Kraak, *J. Chrom.* 477 (1989) 95.
- [50] A.L.Crego, J.C.Díez-Masa, M.V.Dabrio, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1615.
- [51] S.A.Rodríguez, L.A.Colón, *Appl. Spectr.* 55 (2001) 472.
- [52] S.A.Rodríguez, L.A.Colón, *Anal. Chim. Acta* 397 (1999) 207.
- [53] P.Narang, L.A.Colón, *J. Chrom. A* 773 (1997) 65.
- [54] Y.Guo, L.A.Colón, *Chromatographia* 43 (1996) 477.
- [55] Y.Guo, L.A.Colón, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2511.
- [56] Y.Guo, L.A.Colón, *J. Microcol. Sep.* 7 (1995) 485.
- [57] K.Nakanishi, N.Tanaka, *Acc. Chem. Res* 40 (2007) 863.
- [58] N.Ishizuka, H.Minakuchi, K.Nakanishi, K.Hirao, N.Tanaka, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 187 (2001) 273.
- [59] K.Nakanishi, K.Naka, *J. Sol-Gel Sc. Techn.* 19 (2000) 65.
- [60] F.C.Leinweber, D.Lubda, K.Cabrera, U.Tallarek, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2470.
- [61] K.Cabrera, *J. Sep. Sci* 27 (2004) 843.
- [62] Y.Suzumura, K.Kanamori, K.Nakanishi, K.Hirao, J.Yamamichi, *J. Chrom. A* 1119 (2006) 94.
- [63] K.Kanamori, K.Nakanishi, K.Hirao, H.Jinnai, *J. Sol-Gel Sc. Techn.* 35 (2005) 183.
- [64] K.Kanamori, H.Yonezawa, K.Nakanishi, K.Hirao, H.Jinnai, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 874.
- [65] K.Kanamori, K.Nakanishi, K.Hirao, H.Jinnai, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 241 (2004) 215.
- [66] K.Kanamori, K.Nakanishi, K.Hirao, H.Jinnai, *Langmuir* 19 (2003) 5581.
- [67] K.Kanamori, N.Ishizuka, K.Nakanishi, K.Hirao, H.Jinnai, *J. Sol-Gel Sc. Techn.* 26 (2003) 157.
- [68] H.Tanaka, *J. Phys. :Condens. Matter* 13 (2001) 4637.
- [69] S.Forster, H.Kolmar, S.Altmaier, *J. Chrom. A* 1265 (2012) 88.
-

- 
- [70] N.Tanaka, H.Kobayashi, N.Ishizuka, H.Minakuchi, K.Nakanishi, K.Hosoya, T.Ikegami, J. Chrom. A 965 (2002) 35.
- [71] S.Forster, H.Kolmar, S.Altmaier, J. Chrom. A 1283 (2013) 110.
- [72] D.Thakur, T.Rejtar, D.Wang, J.Bones, S.Cha, B.Clodfelder-Miller, E.Richardson, S.Binns, S.Dahiya, D.Sgroi, B.L.Karger, J. Chrom. A 1218 (2011) 8168.
- [73] Q.Luo, T.Rejtar, S.-L.Wu, B.L.Karger, J. Chrom. A 1216 (2009) 1223.
- [74] Q.Luo, Y.Gu, S.-L.Wu, T.Rejtar, B.L.Karger, Electrophoresis 29 (2008) 1604.
- [75] G.Yue, Q.Luo, J.Zhang, S.-L.Wu, B.L.Karger, Anal. Chem. 79 (2007) 938.
- [76] Q.Luo, G.Yue, G.A.Valaskovic, Y.Gu, S.-L.Wu, B.L.Karger, Anal. Chem. 79 (2007) 6174.
- [77] D.A.Collins, E.P.Nesterenko, D.Brabazon, B.Paull, Anal. Chem. 84 (2012) 3465.
- [78] E.Nesterenko, O.Yavorska, M.Macka, A.Yavorskyy, B.Paull, Anal. Methods 3 (2011) 537.
- [79] J.J.van Deemter, F.J.Zuiderweg, A.Klinkenberg, Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271.
- [80] F.Gritti, G.Guiochon, J. Chrom. A 1228 (2012) 2.
- [81] T.J.Causon, K.Broeckhoven, E.F.Hilder, R.A.Shellie, G.Desmet, S.Eeltink, J. Sep. Sci 34 (2011) 877.
- [82] J.C.Giddings, Anal. Chem. 37 (1965) 60.
- [83] H.Poppe, J. Chrom. A 778 (1997) 3.
- [84] G.Desmet, D.Clicq, P.Gzil, Anal. Chem. 77 (2005) 4058.
- [85] G.Desmet, D.Clicq, D.T.-T.Nguyen, D.Guillarme, S.Rudaz, J.-L.Veuthey, N.Vervoort, G.Torok, D.Cabooter, P.Gzil, Anal. Chem. 78 (2006) 2150.
- [86] K.Broeckhoven, D.Cabooter, S.Eeltink, G.Desmet, J. Chrom. A 1228 (2012) 20.
- [87] K.Broeckhoven, D.Cabooter, F.Lynen, P.Sandra, G.Desmet, J. Chrom. A 1217 (2010) 2787.
- [88] G.Desmet, D.Cabooter, LCGC Europe 22 (2009) 70.
- [89] F.Zhou, Y.Lu, S.B.Ficarro, J.T.Webber, J.A.Marto, Anal. Chem. 84 (2012) 5133.
- [90] W.M.A.Niessen, H.P.M.van Vliet, H.Poppe, Chromatographia 20 (1985) 357.
- [91] H.Poppe, J. Chrom. A 778 (1997) 3.
- [92] R.Swart, J.C.Kraak, H.Poppe, Chromatographia 40 (1995) 587.
- [93] F.Detobel, H.Eghbali, S.De Bruyne, H.Terryn, H.Gardeniers, G.Desmet, J. Chrom. A 1216 (2009) 7360.
- [94] F.Detobel, S.De Bruyne, J.Vangelooven, W.De Malsche, T.Aerts, H.Terryn, H.Gardeniers, S.Eeltink, G.Desmet, Anal. Chem. 82 (2010) 7208.
- [95] W.De Malsche, S.De Bruyne, J.Op De Beek, S.Eeltink, F.Detobel, H.Gardeniers, G.Desmet, J. Sep. Sci. 35 (2012) 2010.
- [96] T.J.Causon, K.Broeckhoven, E.F.Hilder, R.A.Shellie, G.Desmet, S.Eeltink, J. Sep. Sci. 34 (2011) 877.
- [97] S.Forster, H.Kolmar, S.Altmaier, J. Chromatogr. A 1315 (2013), 127-134.









---

## Eidesstattliche Erklärung

---

Simon Forster  
Wiethasestraße 64  
50933 Köln  
0177-3267884  
simon.forster@arcor.de

### Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Köln, 26.10.2013

---

Simon Forster





---

Simon Forster  
Wiethasestraße 64  
50933 Köln  
0177-3267884  
simon.forster@arcor.de

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Köln, 26.10.2013

---

Simon Forster



---

## Lebenslauf

---

Simon Forster  
Wiethasestraße 64  
50933 Köln  
0177-3267884  
simon.forster@arcor.de

## Persönliche Daten

Geburt:	14. August 1982 in Bad Ems
Eltern:	Helga und Erhard Forster
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

## Akademischer Werdegang

10/2010 – 08/2013	Promotion bei Prof. Harald Kolmar (TU Darmstadt), in Kooperation mit Merck KGaA, Darmstadt (Dr. Stephan Altmaier)
12/2009 – 07/2010	Diplomarbeit bei Prof. Harald Kolmar (TU Darmstadt) und PD Dr. Egbert Müller (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart)
10/2003 – 07/2010	Chemiestudium an der TU Darmstadt (Abschluss: Dipl.-Ing.)

## Zivildienst und Schulbildung

08/2002 – 05/2003	Zivildienst bei Ambulante Dienst gGmbH in Kiel
1993 – 2002	Mons-Tabor-Gymnasium in Montabaur (Abitur)
1990 – 1993	Waldschule in Montabaur (Grundschule)
1989 – 1990	Erich-Kästner-Schule in Altenkirchen (Grundschule)

Köln, 26.10.2013

---

Simon Forster

